

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
27. November 2003 (27.11.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/097869 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C12Q 1/68**

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE03/01572

(22) Internationales Anmeldedatum:
16. Mai 2003 (16.05.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102 22 632.6 17. Mai 2002 (17.05.2002) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): **CON / CIPPIO GMBH** [DE/DE]; KYSELHÄUSER
STRASSE 77, 06526 Sangerhausen (DE).

(72) Erfinder: **SÜSS, Karl-Heinz** (verstorben).

(74) Anwalt: **BAUMBACH, Fritz**; Robert-Rössle-Strasse 10,
13125 Berlin (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.



WO 03/097869 A2

(54) Title: MICROSATELLITE MARKERS FOR GENETIC ANALYSES AND THE DIFFERENTIATION OF ROSES

(54) Bezeichnung: MIKROSATELLITENMARKER FÜR GENETISCHE ANALYSEN UND ZUR UNTERSCHIEDUNG VON ROSEN

(57) Abstract: Microsatellites from plants of the rose family, including said isolated microsatellites, primers from flanking regions of the microsatellites, a method for the production of microsatellites and the use thereof in the genotyping of plants from the rose family.

(57) Zusammenfassung: Mikrosatelliten aus Pflanzen der Gattung Rosa, einschließlich den isolierten Mikrosatelliten, Primern aus flankierenden Regionen der Mikrosatelliten, ein Verfahren zur Herstellung der Mikrosatelliten und deren Verwendung zur Genotypisierung von Pflanzen der Gattung Rosa.

Mikrosatellitenmarker für genetische Analysen und zur Unterscheidung von Rosen

Der Erfindung betrifft neuartige genetische Marker für genetische Analysen und zur
5 Unterscheidung von Rosen.

Mögliche Anwendungsgebiete sind marker-gestützte Selektion und Herkunfts- und
Variationsanalysen in Pflanzenzüchtung, Gartenbau und Landwirtschaft.

Stand der Technik

10 Rosa ist eine Gattung mit über 20 Arten allein in Deutschland, deren taxonomische
Einteilung sich noch weitgehend in der Diskussion befindet (Haeupler H., Muer T.,
Bildatlas der Farn- und Blütenpflanzen Deutschlands). Die Gattung umfaßt Arten
unterschiedlicher Ploidiestufen und unterschiedlichster geographischer Herkunft. Eine
15 Vielzahl von Wildrosenarten kommt auf allen Kontinenten der Nordhalbkugel vor.
Zudem sind natürliche Hybriden von im selben Habitat vorkommenden Rosenarten
häufig, wodurch die Definition klar differenzierter Arten zusätzlich erschwert wird.

Andererseits ist die leichte Kreuzbarkeit von verschiedenen Rosenarten die Grundlage
20 der großen Vielfalt von durch Züchtung entstandenen Sorten. Diese Vielfalt umfaßt
Sorten mit unterschiedlicher Blütenfarbe und -form, unterschiedlicher Blühdauer
(jährlich nur einmal blühend oder remontierend), Pflanzengröße und Wuchsform
(Strauch-, Hecken-, Beet-, Kletter-, Bodendeckerrosen usw.), Art der Belaubung und
Bestachelung, Aussehen der Früchte (Hagebutten), Winterhärte, Krankheitsresistenz
25 und Ansprüchen an die Bodenqualität.

Für eine sichere Bestimmung von Arten und Sorten (die meist Ergebnisse komplexer
Kreuzungen sind) ist in den meisten Fällen Blüte, Frucht, Bestachelung, Belaubung und
Wuchsform mit einzubeziehen. Somit ist im Allgemeinen auch für den Fachmann
30 kurzfristig lediglich eine Zuordnung zu einer Gruppe von Arten und Sorten möglich,
nicht aber eine eindeutige Bestimmung.

Aufgabe-Lösungszusammenhang

Die Aufgabe der Erfindung besteht darin, neue Mikrosatellitenmarker zur genetischen Analyse von Pflanzen der Gattung Rosa bereitzustellen.

5

Die Aufgabe der Erfindung wird gemäß den Ansprüchen realisiert.

Wesen der Erfindung

- 10 Die erfindungsgemäßen Marker basieren auf der Amplifikation bestimmter hypervariabler Genomabschnitte, den sogenannten Mikrosatelliten, mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR). Zur spezifischen Amplifikation werden für jeden Mikrosatelliten-Locus zwei Primer, jeweils links und rechts in den flankierenden Sequenzen benötigt. Diese Primer sind im Durchschnitt 23 +/- 5 Basen lang und durch
- 15 ihre Sequenzen definiert. Ein Mikrosatellitenmarker ist im Prinzip eine sequence tagged site (STS), welche durch zwei spezifische Primer definiert ist. Diese Primer flankieren, jeweils links und rechts eine sogenannte Mikrosatellitensequenz. Eine Mikrosatellitensequenz ist definiert als tandemrepetitive Wiederholung einer Di-, Tri- oder Tetranukleotidsequenz, beispielsweise $(GA)_n$, wobei $n \geq 8$ ist. Es treten auch
- 20 zusammengesetzte Mikrosatellitensequenzen auf, beispielsweise $(GT)_n(AT)_n$, sowie imperfekte Sequenzen, bei welchen einzelne Basen mutiert sind, beispielsweise $(GT)_nCA(AT)_n$. Zwischen verschiedenen Linien und Sorten kommt es zu Variationen der Anzahl der Repeats an einem bestimmten Locus. Dies führt nach Amplifikation des Mikrosatelliten mittels der spezifischen Primer in den flankierenden Sequenzen zu
- 25 PCR-Produkten verschiedener Länge und damit zu Polymorphismus. Diese Polymorphismen werden stabil vererbt und können daher als genetische Marker verwendet werden. In manchen Fällen treten auch Nullallele (kein sichtbares Fragment) auf, wenn Mutationen innerhalb der Bindungsstelle für die Primer vorhanden sind.
- 30 Über die biologische Funktion dieser der repetitiven Fraktion des Genoms zugeordneten Motive gibt es bisher keine gesicherten Erkenntnisse. Es wurde jedoch festgestellt, daß die Anzahl der Wiederholungen eines Mikrosatellitenmotivs zwischen nah verwandten Arten, Sorten und Linien variabler ist als der übrige (insbesondere codierende) Teil des

Genoms. So könnten z.B. drei Rosensorten einen Mikrosatelliten tragen, der in der Länge variiert (12, 14 und 17 Wiederholungen des Motivs GT), dessen flankierende Sequenzen aber in allen drei Sorten identisch sind. Somit kann durch PCR relativ leicht ein Längenunterschied nachgewiesen werden: ein Primerpaar bestehend aus je einem
5 Primer links und rechts von der Mikrosatellitensequenz wird zur Amplifikation eines DNA-Fragments aus jeder der drei Linien verwendet.

Diese Fragmente unterscheiden sich dann in ihrer Länge: das Produkt der zweiten Sorte ist um 4 bp grösser als das der ersten Sorte, das Produkt der dritten Sorte um 10 bp. Dieser Längenunterschied (Längenpolymorphismus) kann z.B. durch verschiedene
10 Techniken der hochauflösenden Elektrophorese (z.B. Kapillarelektrophorese) nachgewiesen werden. Damit sind diese drei Rosensorten eindeutig unterscheidbar, und zwar in jeder Entwicklungs- und Verarbeitungsstufe, aus der DNA gewonnen werden kann (Blatt, Blüte, Frucht, Same, Keimling, evtl. auch Rosenöl, Hagebuttenmarmelade, Tee, Trockensträucher usw.).

15

Die Auftrennung und Detektion der erhaltenen PCR-Produkte kann mit verschiedenen technischen Varianten durchgeführt werden. Für die Auftrennung der Fragmente können hochauflösende Agarosegele, native Polyacrylamidgele oder denaturierende Polyacrylamidgele (=Sequenziergele) verwendet werden. Die Auftrennung kann auch
20 auf massenspektrometrischem Wege durchgeführt werden. Die Detektion der Fragmente kann je nach Trennungssystem über Ethidiumbromidfärbung, Silberfärbung oder bei radioaktiver Markierung der PCR-Fragmente über Autoradiographie erfolgen. Eine weitere sehr effektive Variante der Auftrennung und Detektion besteht im Einsatz eines automatischen Sequenziergerätes mit farbstoff- bzw. fluoreszenzmarkierten
25 Primern. Hierzu ist erforderlich, einen Primer aus jedem Mikrosatelliten-Primerpaar farbstoff- bzw. fluoreszenzmarkiert zu synthetisieren. Aus der PCR-Amplifikation resultiert ein markiertes Produkt, welches von dem Sequenziergerät detektiert werden kann. Dabei werden für jede Probe farbstoff- bzw. fluoreszenzmarkierte Größenstandards in derselben Spur mit aufgetrennt. Eine spezielle Software erlaubt es
30 danach, die absolute Größe jedes aufgetrennten Fragmentes zu berechnen und somit auch Fragmente zwischen verschiedenen Gelläufen zu vergleichen. Mit dieser Methode können pro Tag mehrere hundert Proben weitgehend automatisch analysiert werden.

Untersucht man eine größere Zahl von Sorten, so geht diese Eindeutigkeit verloren: Bei 100 Sorten werden mehrere Sorten dieselbe PCR-Produktgröße zeigen und durch einen einzigen Mikrosatellitenmarker nicht voneinander unterscheidbar sein. Deshalb müssen mehrere Mikrosatellitenmarker, die unabhängig voneinander in ihrer Länge variieren, parallel untersucht werden. Daraus ergibt sich für jede untersuchte Rosensorte eine eindeutige Kombination von Mikrosatelliten-Fragmentlängen, die als der „Fingerprint“ dieser Sorte bezeichnet werden kann.

Für Rose wird eine Anzahl von 25 Mikrosatellitenmarkern ausreichen, um über 90% der im Handel befindlichen Sorten voneinander zu unterscheiden. Bei Weizen liegt die Zahl z.B. bei 21 Markern für eine Unterscheidung von 95% aller Sorten. Mit diesem Ansatz nicht unterscheidbar bleiben sogenannte „Sports“, also neue Rosensorten, die durch Spontanmutation aus einer bereits existierenden Sorte hervorgegangen sind und sich in nur einer Eigenschaft (z.B. Blütenfarbe oder Wuchsform) von dieser unterscheiden. Die beiden Genome sind in diesem Fall, abgesehen von der Mutation, identisch und mit dem beschriebenen Markersset wahrscheinlich nicht zu differenzieren.

Erfindungsgemäß werden Mikrosatellitenmarker bereitgestellt, die folgende Primerpaare mit zugeordneten Mikrosatellitensequenzen bzw. eine Anzahl davon enthalten und die Loci verschiedener Chromosomen des Genoms von Pflanzen der Gattung Rosa amplifizieren und daher zur Genmarkierung Verwendung finden.

Name	Motiv	Produkt -größe (bp) in "Licht- blick"	Primer F* 5'→3'	Tm	Primer R 5'→3'
RMS001	GT&GC	242	TTCAAAATTGCTGCCCCCTTAG	57.1	TACCAGTTGAGTGAGAAATAGTT
RMS002	GA	138	AATAATTTTCTTTTGGTA	36.5	GATTGTGTTTCACTATTCA
RMS003	GA	151	TGGAAAGGAAAGCAACA	52.9	AAGTAGGCAGAAAGTGACAGACAT
RMS004	GT&AT	143	CAGGCCAAGGAAAGAGGTAAGTAAA	55.0	CGTATGCGCGGTGTAGGAAGG
RMS005	GA	143	CTACCGGTGACCAGTGACGA	53.1	ATTTTGCCCTCTCCCTTTGT
RMS006	GT&GA	114	ACCGGTCTCATCTTTTCCATTG	53.0	GTAGGTCGGTCCGTTCTGTCA
RMS007	GA	171	TCTTTCGCACTCCGACAA	48.4	TATGCCATTTCAGACTCTCCAACAC
RMS008	GA	176	TCTCTGCGACAAAACAAACACT	53.4	CCATGAAAGCGGGGAGAGGA
RMS009	CT>	145	ATTGGCAAAAGATTCTCCTAC	47.3	ACTTGGTAATTTCGAGCATAA
RMS010	GA	105	GGTTGGGGGAAATTGAAGCAGAGA	61.2	TCTTTTCTTCTACAAACCCCAACCAAC
RMS011	GT	190	TAGAAACGACCAATAAAAAGAGG	47.9	TAAACGAAACATCATCAATAGCA
RMS012	GT	141	ATAGAAAAATAGAGGGGTGTG	48.8	GATCGAAAAAGTGGTCAAAATA
RMS013	GA	208	GCCTTAGCCGGGGTTTTCAA	57.8	GATCAATACCGAACTAACAAAG
RMS014	GA	124	TATTCTTTCTTCCCACCGACGAC	56.1	CCTCACTGCCAACCCAACTGT
RMS015	GA	185	TAATGTAGGCAGATATAAAGGAGT	46.5	GCAGCTGCACAACAAGGAA
RMS016	GA	121	GGCCTGACCTTTCATTTG	55.1	AACCGCTGCTGCTTTCATTTT
RMS017	AT>	246	AGTCCCCTTATTTTCAGG	46.2	AGTTGGCTTATGGCTTTT

RMS018	GT	125	46.4	TTTTGGGTGGGTAAAGTTTT	48.0	TTGGCCAATAAGGAAGACA
RMS019	GA	104	57.1	ACCGTTTCCATTACCCCTTTCACC	57.1	CGTCGGCCATGGATTTTGTGA
RMS020	GA	239	59.9	AGGCGCCCATGC AAAATCAA	47.9	TTCCCTAACGC AAACCTATGTAAAT
RMS021	GA	188	50.9	AATTCCTCTTACCCCAAAACAC	55.2	CCGGCGAAGTCCCTATG
RMS022	GA	170	51.3	AAGAAGATAAATTAGGGGAAAAA	52.6	GCGCGAACATATTGATTGGT
RMS023	GT	170	42.4	TTTGCTATTAAATTACAGATGAA	51.3	TAAACAATATAAATGGGGAGTAAAT
RMS024	AT>	200	44.0	ACTACTGTAAATAATGAAAAATCC	50.5	GTAGTAGCGGTTGCAAGAAAAATA
RMS025	AT / GT	167	33.4	TAATGTAAAGCTAACTAATCT	47.1	TTTTAAATTTTCGGTGGAGA
RMS026	GT	129	38.8	ATAGATAATGTTTGGGTTC	39.3	AATGTCAGGTTTGTGTATG
RMS027	AT>	189	47.7	ACCGTTGTGCTTATCAGGA	48.2	ATTGGTGTGCTTTTACATTAC
RMS028	AT>	237	50.0	TAGGCAAGACCATGAACCCAG	49.9	TGTGCCTGTTTGCCTTGTGTA
RMS029	GA	201	56.8	GGATAAAACCAACGGGACAGACTC	58.3	TCCGACACCATCCCTCCTACATAA
RMS030	GA	201	46.2	GATAAAATTTCAAGCGGAGAG	50.9	AAAAGATGAACGACCCCAATAAT
RMS031	GA	202	40.5	TATATTAAAGAACAAAGTGAGAAC	43.1	GTGGCTATCGAAAAACAA
RMS032	AT>	193	40.7	AGAAAACCAACCTTAGCAT	44.1	AACCATCCATAATTTTCAGTCA
RMS033	GA	203	60.0	CAAGAGATGTCGGAAAAGCAGGAAG	59.9	TGCACACCCCAAATTTACAAAACCACA
				T		
RMS034	GA	136	55.6	GCTTCTCGGTCTCGTGCTCTC	55.2	CTCCCGCTCAAATCAATAAATCTC
RMS035	GA	229	58.3	CCTCCTTGGCAGCCCTTTTCATT	56.1	ATCGGCTATCCACATCGTCTACAC
RMS036	GA	235	56.4	CTCGCGGCCCAATAACAAT	55.9	TTGCCCTTACATTTTCTCTACTCCATA
RMS037	GA	228	59.9	AACCTCGGAGCCGCATTTTCAC	52.1	AGTTTCTCTCGCCAGATAAGC

RMS038	GA	115	50.3	GTGATAAGAGCAAAAACAAGATGG	53.8	CTCGCGGAAGCCTCAAAA
RMS039	2xGA	124	52.1	GCTGCTTTCTCCAATCAACAA	52.1	CAGCTCAGCAAAGGGGACTA
RMS040	GT	143	46.6	AACCCCAAACTTCTCTAAACT	45.7	TCTGTATCTACTGTGGCTAAACC
RMS041	GA	249	49.2	TTAAACCCAAAGCACCAAAAT	48.5	ACCTTCACCGATGTATCACC
RMS042	AT>	181	55.4	GCAATGGCCAGGCTCTTCAC	55.5	ATGCCAAACGTCTCAGTCAACC
RMS043	GA	215	52.6	GATCAAAAGATGGGTTCTCCTCTC	54.6	AGGGGAATCTTTGAAAAGTCGTTT
RMS044	AT	204	49.6	ACCGATGGATGGCAATAAC	49.7	ATACAGGACATAAACGGGTACC
RMS045	AT>&AT &GA	233	40.0	GAAAAATAAGGACATCATCTAC	41.4	GGTGCCCTCCATTATTAC
RMS046	AT>	247	45.0	AAAGGATTGCTGGATGTG	42.4	TATTCGCGTGGACTCTAT
RMS047	GA	98	51.6	GCTCCCTCAATTTCCTCACTCA	51.7	ACCAACCCAAATTCGCTCAT
RMS048	GA&AT	197	41.8	ATAAGTATGAAAAAGTAAAAATGAT	44.0	GTATACTAGAAAAACAAAACTGGT
RMS049	AT>	178	39.9	AAAAATACAACCGAAAAA	52.6	CCAACCCGTCAAGGCTAAA
RMS050	AT&GA	169	43.1	TAAAGCCTAAGAAAAAATCATTT	48.6	CAGCCGTCAGATTCACTTG
RMS051	GT	215	46.5	AGTAGACTGTCTCTCATTAGC	50.9	ATACCATCAGAGAAGAGACGACAC
RMS052	GA	224	59.8	TTAGCCGTTAAATTGAGTCGACAACCT	57.0	TGATGAACCCCAATAGAAATGAAAAACA
				C		GA
RMS053	GA	160	56.9	GGCGGTAGCTAGTGACTGGAATCT	55.4	CCCTTACCCTTACCCCTTTGTTCAC
RMS054	AT&GA	239	48.8	CTGGGAGGAGAACTCTGTCA	48.7	TAGCTTATTAGTCTGCATTGATGA
RMS055	GA	192	53.4	TGATCACAAAGAGCTTTTCAAGTTTAG	53.4	AGTTAGGCGCATGTACAAAGAAAAAT
RMS056	GA	133	36.7	TGTGTAGATTAGCATTTCC	35.2	GATCTAGGATGATTCAATA

RMS057	GAA / GA	174	63.4	CGAGGTGGGTAAAGGGCGAACAAG	63.5	CCCATCCAAAAGCGAGACGACGAC
RMS058	GT	143	50.6	CAACCCCTGAAGCCTGAA	47.4	TTTGTAACCCCATTTTGACCATA
RMS059	AT>	126	42.6	ACAGTCTTATAGTGGCTTCC	44.9	TACAGGGTTCTAAATTGATACATAC
RMS060	GA	219	41.6	CATTCAATTTGACTCTAAGGA	43.5	TATTTCTGGTCTAAGCTATTGTAA
RMS061	GT	211	49.6	ATATCAGCCGTCCTCATCAG	38.9	TTAGAAAATCCCAACAT
RMS062	GA>	189	50.4	GCGAACGGCATTTACTTGT	50.5	GGTTGTCTGGGTGGTTTTT
RMS063	GAA	90	60.4	CCACCGCCCAACAATCACAATG	59.9	GCTCTGCGGAGTGGGAATGGT
RMS064	GA, GT	227	43.7	TTTTTGCAATATGTGAAGC	50.3	GATTGGTCAACCGATATGTAGAA
RMS065	GA	111	42.2	TATAGCTCGGTAGATTCAAA	56.2	CCAGACTGCCCCCAACTCATA
RMS066	GA	198	48.8	TCCACCCACAGACCACAG	49.5	AAGCTCCCCTACGATTTCACTC
RMS067	GA	169	50.2	CAATCTGCAATCCGAATCC	47.5	ATGGTGAAAAACAGAAAATACTACA
RMS068	GA	199	52.8	GTGCGCTTTCTGTCTCCATT	51.8	CATTTTGTCTACGTTTTCAC TTC
RMS069	GT&GA	232	53.0	TCGGAGATTAAAGAGTGAGGTGAGT	56.9	GTGCCCCACTTACCCAAACCATC
RMS070	GA	173	45.2	TGCCTCTCGATACAAACC	54.0	AATAAGAAACCAATACCCCGAAGAG
RMS071	GT	90	44.4	GTTAGCATCTGGCACATTAT	46.3	AGTTCCCTTGACCAGCAGAG
RMS072	GA	110	46.3	TTAGCTCAAGAAATTCATCAAAAG	51.9	TCCAAACCGAGCTAAGAAAAACT
RMS073	AT>/GA	156	46.0	AAACCCCTTTTATGTAGAAAGTAG	45.5	TAAAAACATGAAAATTATAACAATAGTG
A						
RMS074	AT>	237	51.5	GCTTCTATCCACAGTTTACCTC	51.0	TTCATGTCAACGCTTCTGTAATAG
RMS075	AT>	237	54.4	GCCCGTAAAGCCCGTAAA	48.3	TTGGTCAACCGATATGTAGAAT
RMS076	GA	180	48.9	TGGATGCAAAACACCTACAAA	58.1	CGTCGCCGGGCATTTCGTC

RMS077	GA>	154	60.375	AGGTGAACATGGGCCAACTA	57.436	TCAAAGAAATGAGTGCCTACTAAGA
RMS078	GT	112	59.585	CCATTCCAAAGTTGCACGTA	60.049	CTCTACTGCCAGCAACCACA
RMS079	GA	182	59.502	CCGGTATGGAGAGGAATGAG	59.841	GCAATTATCCTTGACACAGAACCC
RMS080	GT	213	59.585	GCTTTCAAAGATGGGAAACCT	59.470	TTGGTATCACATTTACTCTCATTTGC
RMS081	GT&GA	164	57.402	TTTGACACACACACACAAACAT	59.784	GACTGAGAAACAAGTCCGTCCT
RMS082	2xGA	113	59.469	AACAACACACGCGGAATATG	59.873	TGCAGTTGGAGTTGGAGTTG
RMS083	GT	90	60.837	GACGTCCGCACTTTAGCAAC	61.720	AGGTCCCTCAGCATAGACGGC
RMS084	GT	185	59.893	GGGAGTCTCAAGAGCTACCGT	58.787	CTTCATGTAAAGCCACTGGACA
RMS085	GA	204	59.923	ATGCCCATGACTATCTTGCC	61.110	TCCAAGATGAAGAATTGCGG
RMS086	GA	150	60.195	TTCGTGTTTCATCTGGCCTCC	59.700	GTTTCGTAGATTCAGGTCGGC
RMS087	GA	229	60.328	GCCCAACTATTCTCCCACT	60.454	CCCACAGTTGTCCAACACAA
RMS088	GA	207	59.955	TCCTGATTCGTATCATCCACTG	59.817	GAAGGCCTCAAGGTTCTCTCT
RMS089	AT>	161	59.107	TTCTTATTGTTGTTTGGAAGAAA	59.394	TCAATAGTGAGGTGCGAGGA
RMS090	GT&GC	204	59.837	TGTGTGTGTATCCATGGCCT	60.080	ATCTGCAATGACAAATGGCAA
RMS091	GA>	207	59.513	GATCAGGGTGAATACCGAGC	59.589	GCCACTCTTCTCTGTCTCTCAA
RMS092	AT>	208	59.546	TGAAATGAGAGACCAATTCCAA	58.762	ATCAAGTGAGCCCGATGGAG
RMS093	GA	116	60.301	CGTTCTCGTTGTTGTATCG	60.540	CCCTCTCTCTCCAGTCACGA
RMS094	GA	175	59.918	TCCTATCCACACCGACATCA	60.125	TCACAAATACCTTCCACTCGC
RMS095	GA	163	59.649	CCAATCTCCTCAACTCCCCAG	59.730	TCAGGGCTTCTTAAAGCTTGC
RMS096	AT>&AT	203	59.485	TGACCAATATGACAGAGAACCAA	58.143	TGATAGCCTTACATATGGAACATT
RMS097	GA>	163	60.162	ATCTGGCTGAACACCCACACA	60.132	CATGCTAACTCTCTCCATGTTCCA

RMS098	GT / GA	172	59.790	CACGTCCCAATTCAGAATTT	59.943	CCCTCAATGGAGAGCAAGAG
RMS099	GA	166	60.088	GGTCTGGTTCCTTGAGGTGA	60.096	CTCTCTCGTCCGAAAGCATC
RMS100	GT&AT	169	59.556	AGAGCTCCGCTCTGGATATG	59.911	AAGCCAAAAGCTTACGTGCAT
RMS101	GA	133	59.291	GAAGAGACTGAAAGCTTGAAGGA	60.388	CTCCTCTCCACTCCTCACCA
RMS102	GT	170	59.891	AACTAAATGGTTGAGATGCCAAA	59.642	GGAAATTCGTTCTTAAAGCTAAGTT
RMS103	GT	193	59.960	ATTATGCGAACCAACGAGG	60.214	TGGCAGCAATTCCTCCCTAAAC
RMS104	GA	209	57.011	CTAAAGCTTGAGCAACAAATG	59.955	GGAGTATTGGCCGTAGGTGA
RMS105	GT&AT	189	58.857	TTGGTCTAATGCCCTATCCC	60.053	CCAGCCCTAGCCATAAATTGA
RMS106	GA	189	58.100	CTCTCCCTCTCTGCAATCAA	59.982	CCTCTTCTCTGCAACCCAAG
RMS107	AT>	194	60.073	CGACCTTGAACTCGATGGAT	59.266	CATGAAAGTGGAGCTAGCTAAGAA
RMS108	GA	183	61.395	GATCGCCATGGCATGTAAAG	59.592	TTCTTCTAGTTTCCGGCTGC
RMS109	GT	115	59.625	TGCAAACTTAAATTCACAGAA	60.012	TGGCCTCTACAGCTCCTGTT
RMS110	GT	194	59.673	TATGAGAAATGAGCGTGTGGG	60.532	TTCCCTCTCATTCCTCTCCCC
RMS111	GA	135	57.738	TTAGTCAATCATCTTCAGTTATCAAGA	59.933	ATTCAATTGGCTTCACTGGG
				A		
RMS112	AT>	227	59.294	CAAGGATACCAGTCGGAGAGA	59.813	AGAAATGGACAGCTCCGAAA
RMS113	GA	174	60.263	CATGGATTGCGTGTCTTCTG	59.955	GGCATCAGAAAGCTGAAAAGG
RMS114	GA	224	60.134	AGTCGCATAACAGGACTGGG	59.894	TTGGGATTTCGGGATAAGTCG
RMS115	GA	222	60.027	CGTGAAAGACGCAAAAGTCAAA	60.059	GGAGGAGAAAGGAGGATTGTG
RMS116	AT>	228	59.989	CACCCACTGGAATACTGGCT	58.724	CGACAAAGCATGACCTGAAAT
RMS117	GA	199	59.950	TCTTCTTCTCTCACCGCCAT	60.074	GGCCGATTGTGTTGACCTAGA

RMS118	(AT&)GT	168	59.075	TGGCTATGGGAAGACATGA	59.545	TCAGACAAATAATGCGTTACCAA
RMS119	AT>	122	59.857	GCACGCACACATATATAACAACAA	59.807	GATATCCGCAGCCAAGAAAG
RMS120	GT	193	57.360	CAGTTGAAAGAGAACCAAGGG	60.162	TGGTGGGTAGGGAAATGAAA
RMS121	GT	94	60.001	TCCTCTCCAAGACACAATATTCAA	60.999	GCCCTCTCTGCTCTCCCTAA
RMS122	GA	229	60.822	ATTCCACTTCCTCCTTCCCA	59.874	GGATTCTTTCCTCCTGACCC
RMS123	GA	167	59.128	AAACACTCTAAGGAGGTATTCCCTAA	59.137	CGAAGTCTCCCATGGTTTCT
RMS124	GT	107	57.353	TTTGTGTCGTGTGTGTAT	58.149	AGGCACAAATACTATCCACCTG
RMS125	GA	160	60.589	AAGTGAAGACTGAGCGACCG	59.694	CTACTCCAAATGTCCGCTTCC
RMS126	GT	210	59.822	AACGACCGCCTAGGAGAAA	58.048	TTGTTTCTGTTCGAAATGGGT
RMS127	GA	220	59.967	TGCCTTTCTAGATTGTGTGA	60.812	TAGTTGTTCTGTCACCCACCC
RMS128	GA	230	60.016	AGCATCACGAGCACATTTCAG	60.470	GCGAAGATTCAACCCCAATGAC
RMS129	GT	229	59.203	ACGTGCACACACTCACACAC	57.100	ACTGATGCAGTTTGCTCTGA
RMS130	GA	126	59.518	CAAAATCAATCTGCAAAACCCA	59.833	TTTGCGAATACCAAGATGCAG
RMS131	GA	230	60.615	CGGCCAGAGATAACAGATGG	58.938	TGTTTGTGTGCTTAACACTACAAACCTT
RMS132	GA	184	59.454	TGTGGTTATGAATTGCTGTG	59.956	TTCAGTTTGGTTGAATGGGAG
RMS133	GA	124	59.731	TCTGCAACAATCAGCAGAAAGA	59.901	ATTTCTGGCAAATCCGAATG
RMS134	GA	226	58.173	TGAGCTCAAGCAATATGCAA	58.817	GGCTGTCTCTGATTCCAGTATG
RMS135	GA	190	60.011	GACCGATTGGAGAGGAATGA	58.909	TTGCCCTTCTCCCTTCTGT
RMS136	GA	114	57.218	GATCATGAGAGTCGCCAAA	59.939	AAGAGGCAGATATGGAGCGA
RMS137	GA	228	60.362	TGTACATGATGATGGGACGC	59.847	GGCAATTGCAAAAGACAGTCA
RMS138	GA&andere	157	60.022	CTTCTGAGAGCCACACACCA	60.339	GCAAAACACATCCCATCATCA

RMS139	GA	187	60.169	CAAGTATCTGCTCAGCAAGC	60.218	CCATCACATTCTGGCTCTTCT
RMS140	GT	123	59.792	CCAATAGCGATGCAATGAGA	59.052	TTGGCTACCACTAACCTCCC
RMS141	GT	202	58.624	ACAGAGACTTGACGCTGCAT	59.668	AGCGTGTGTAGCTAGGGAGC
RMS142	2 x GA	186	60.255	TGGCCTCAAACGTCTTCTACC	58.588	CCTGAAATATCCCCTATGTCAGAAA
RMS143	GA	230	60.261	GTGGGAAGTGTGGGAACAAC	59.617	GCCTCATCCTGTGCCATCTTC
RMS144	GT	202	57.412	TTTATCACTGTGCACAAGGCATTA	59.661	GAGCTCCATGAGGTGTTTCC
RMS145	2 x GA	122	60.397	TGCTCACTTACCCAGAAAGCC	59.350	TCTCTCTCATTTTCAAGAGTAAACCC
RMS146	GT	186	59.454	ACAAGGCAATTCACTTGGTT	58.253	TTTCTGGGCCCTGCATAAATA
RMS147	AT>	191	59.583	CCAATCTCAATAACACCGAGC	59.767	TCTTTGTGCTGCTAATGCTCA
RMS148	GT	230	59.756	TTTAGCAGGCATTGGCACTAT	59.698	ACCTCCAGCACCAACTCCT
RMS149	AT>&AT	203	59.566	CGGTGTGTAGTTGATTCGGA	60.195	TCAAATTTCTGGCCCTCTGTCC
RMS150	GT	209	60.251	TGCTGCAGTATGATGCCAAT	59.055	TGGAATCCTTTTCCCTTCTT

Erklärung zur obenstehenden Tabelle:

Spalte A: Name	Name des Mikrosatellitenmarkers; RMS für RosenMikroSatellit; fortlaufende Nummern von 001 bis 150
Spalte B: Motiv	Mikrosatellitenmotiv in der DNA-Sequenz, fuer das ein Primerpaar gesetzt wurde
Spalte C: Produktgröße (bp)	anhand der DNA-Sequenz ermittelte theoretische Groesse des PCR-Produkts in der Rosensorte Lichtblick
Spalte D: Tm	theoretische optimale Annealingtemperatur des F-Primers
Spalte E: Primer F* 5'->3'	Sequenz des F-Primers
Spalte F: Tm	theoretische optimale Annealingtemperatur des R-Primers
Spalte G: Primer R 5'->3'	Sequenz des R-Primers

Diese Marker zeichnen sich durch einen hohen Grad an Polymorphismus zwischen verschiedenen Rosensorten bzw. -linien aus und detektieren in der Regel in verschiedenen Rosenlinien mehrere Allele pro genetischem Locus.

Sie sind daher für "DNA fingerprinting", Sortenidentifikation, Verwandtschaft- bzw. Ähnlichkeitsstudien und alle Formen von genetischen Kartierungen, einschließlich der Kartierung von Einzelgenen und quantitativen Merkmalen (QTLs) verwendbar. Außerdem ist ihr Einsatz sehr gut für eine Automatisierung geeignet und es ist möglich, die Detektion der Produkte mit nichtradioaktiven Methoden durchzuführen. Mit Hilfe dieser erfindungsgemäßen Marker ist z.B. die Möglichkeit einer Unterscheidung nahezu aller im Handel erhältlichen Rosensorten gegeben.

Damit wird es möglich, Rosensorten und -arten, die sich bereits in der Datenbank befinden, im vegetativen Zustand zu bestimmen. Ein weiterer Vorteil der Erfindung liegt in der Identifikation oder Zuordnung anonymer Rosenherkünfte zu einer Verwandtschaftsgruppe. Ferner wird es möglich, Linien, welche unter verschiedenen Sortennamen gehandelt werden, zu identifizieren. Auch kann die genetische Vielfalt einer Gruppe von Linien festgestellt werden (z.B. die genetische Vielfalt im Zuchtmaterial eines einzelnen Züchters). Es wird auch möglich, die genetische Distanz von Eltern einer geplanten Kreuzung und damit möglicherweise auch die Erfolgsaussichten der Kreuzung abzuschätzen.

Ausführungsbeispiel

Das folgende Ausführungsbeispiel dient der Erläuterung der Erfindung und schränkt die Erfindung in keinem Falle ein.

Verwendete Methoden

DNA-Isolierung

a. Präparation nach der Methode von Saghai Maroof et al. (1994) Proc. Natl Acad Sci USA 91: 5466-5470:

Etwa 1.5 g Blattmaterial wurden in flüssigen Stickstoff gemörsert, mit 15 ml CTAB-Puffer versetzt und 60 min bei 65 inkubiert. Die Mischung wurde zweimal mit Chloroform extrahiert und die DNA mit Ethanol gefällt. DNA-Fäden wurden gefischt, in 70% Ethanol gewaschen und in TE-Puffer aufgenommen. Nach RNase-Verdau wurde mit Phenol und nochmals mit Chloroform extrahiert, mit Ethanol gefällt und wieder in TE gelöst.

b. DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen #69104)

100 mg Blattmaterial wurden in flüssigen Stickstoff gemörsert und nach Anleitung des Herstellers verarbeitet.

In beiden Fällen wurde die Konzentration der gewonnenen genomische Rosen-DNA über ein Agarosegel abgeschätzt. Für jede Sorte wurde eine Verdünnung von 2.5 ng/μl in Wasser hergestellt. Je 2 μl dieser Verdünnung wurden in PCR-Platten vorgelegt und eingetrocknet und konnten in diesem Zustand bis zur Verwendung bei Raumtemperatur bis zur Verwendung gelagert werden.

2. PCR-Reaktionen

Die PCR-Reaktionen wurden im 25 μl-Volumen in einer 96-well-Mikrotiterplatte durchgeführt. Die Reaktion enthielt:

200 nM Primer 1

200 nM Primer 2

je 200 µM dATP, dGTP, dTTP, dCTP

1 x PCR-Puffer (50 mM KCl, 10mM TRIS-HCl (pH 9.0 bei 25°C), 1.5 mM MgCl₂, 0.1% Triton® X-100; wird als 10 x Stock zur Polymerase #M2668 mitgeliefert)

ca. 5 ng genomische Rosen-DNA

0.5 U Taq-Polymerase (Promega #M2668)

Die PCR wurde in GeneAmp PCR System 9700 PCR-Maschinen (Applied Biosystems) durchgeführt. Das Temperaturprofil ist in der folgenden Tabelle dargestellt:

Schritt 1: Initial-Denaturierung	94°C	3 min	
Schritt 2: Denaturierung	94°C	1 min	Schritt 2-4
Schritt 3: Annealing	60°C	1 min	45x
Schritt 4: DNA-Synthese	72°C	2 min	wiederholen
Schritt 5: Final-Synthese	72°C	10 min	
Schritt 6: Kühlung	12°C	8	

3. Fragmentanalyse

Die Größenanalyse der PCR-Produkte wurde auf einem ABI3100-Sequenziergerät durchgeführt. Es wurden Kapillaren einer Länge von 36 cm verwendet, die mit einer aus dem Polymer POP4 (Applied Biosystems) gefüllt waren. Die Laufbedingungen waren: Injektionszeit 20 ms, Spannung: 15 kV, Laufzeit: 1080 s

Als interne Standardfragmente wurden NED-markierte Fragmente der Länge 73 bp, 121 bp, 156 bp, 235 bp, 303 bp, 377 bp und 434 bp verwendet. Die zu analysierenden PCR-Fragmente trugen für ein später im Hochdurchsatz anzustrebendes Multiplexing eine der drei Markierungsfarben HEX, ROX oder FLU.

Die Analyse der gewonnenen Daten erfolgte über die Programme GeneScan und GenoTyper (Applied Biosystems).

Erstellen einer genomischen Plasmidbibliothek

DNA der Rosensorte „Lichtblick“ wurde aus Laubblättern isoliert. Diese DNA wurde einem Verdau mit dem Restriktionsenzym *Pst*I unterzogen. Über ein präparatives Agarosegel wurde die Fraktion der Restriktionsfragmente von ca. 5 bis 30 kb isoliert

und einem weiteren Restriktionsverdau mit dem Enzym *Mbo*I unterzogen. Über ein zweites präparatives Gel wurden die Fragmente im Bereich von 500-1500 bp isoliert und in den Plasmidvektor pUC18 kloniert. Die so entstandene genomische Plasmidbibliothek von Rose wurde transformiert (*E. coli* XL2-Blue MRF') und auf Petrischalen plattiert.

Entwicklung der Mikrosatelliten

Durch einen Pipettierroboter wurden die Bakterienkolonien als Referenzbibliothek (ein Klon pro Vertiefung) in Mikrotiterplatten überführt. Die Klone wurden dann in hochdichter Anordnung („High-density-array“) auf Nylonmembranen überführt (spotting). Durch radioaktive Hybridisierung mit einem synthetischen Mikrosatelliten-Oligonukleotid (GA_n oder GT_n) wurden die Plasmidklone identifiziert, die einen entsprechenden Mikrosatelliten enthalten. Diese Plasmide wurden für die Sequenzierung im μ g-Maßstab präpariert und sequenziert. Durch spezielle Software (Primer 3.0 bzw. DNASTar/PrimerSelect von Lasergene) wurde Primerpaare abgeleitet, die das Mikrosatellitenmotiv einschließen und ein theoretisches Produkt von 80-250 bp erzeugen.

Auswahlkriterien

Durch PCR und Auftrennung der entstandenen PCR-Fragmente über ein ABI3100-Sequenziergerät von Perkin Elmer wurden Funktionalität (es entsteht ein Fragment im erwarteten Größenbereich) und Spezifität (es entstehen ein oder wenige klar ansprechbare Fragmente) der PCR mit den Primerpaaren überprüft und bei Bedarf optimiert. Zuverlässig funktionierende, polymorphe Mikrosatelliten, die eine klare Differenzierung der 30 für einen Vortest verwendeten Rosensorten erlauben, werden als Markersset für weitere Genotypisierungen ausgewählt. Die Ergebnisse aus der Untersuchung der verschiedenen Sorten werden in einer Datenbank archiviert, die es erlaubt, hinzukommende Sorten als identisch oder nicht identisch mit bereits untersuchten Sorten oder Linien zu identifizieren oder alternativ Verwandtschaft zu den bereits untersuchten Sorten zu bestimmen.

Durchführung der Genotypisierung

Für die weitere Analyse der 84 für die Genotypisierung geeigneten Marker wurden 32 Rosenlinien verwendet (Tabelle 1). Wiederum wurde zunächst DNA präpariert, wobei größere Schwierigkeiten bei der DNA-Präparation aus den im Spätsommer 2001 erhaltenen ausgewachsenen Laubblätter auftraten. Wahrscheinlich werden die Probleme durch lösliche Kohlenhydrate verursacht, die sich in älteren Blättern ansammeln. Das Pflanzenmaterial vom Mai diesen Jahres dagegen ließ sich problemlos verarbeiten. Die Ergebnisse der Fragmentanalysen, die als "Fingerprint" einer Sorte bezeichnet werden können, wurden in einer Datenbank erfasst. Als Beispiel sind die Daten für Mikrosatellitenmarker RMS059 dargestellt (Tabelle 2).

Nach der Genotypisierung, die zweimal an unabhängig präparierter DNA durchgeführt wurde, konnten die analysierten Mikrosatellitenmarker nach ihrer Qualität in zwei Kategorien eingeteilt werden: "brauchbare" und "gute" Marker.

Als Bewertungskriterien wurden folgende Punkte herangezogen:

- wird eine überschaubare Zahl von Fragmenten (Allelen) pro Rosensorte erzeugt (in der Regel 1-4 Fragmente)?
- werden verschiedene Allele etwa gleich stark amplifiziert?
- erschweren Stotterbanden und Schattenpeaks die Auswertung?
- sind die Fragmente in unabhängigen Experimenten reproduzierbar?
- ist die Amplifikation unabhängig von DNA-Qualität und -Menge?
- besteht ein Gleichgewicht zwischen den Allelen, d.h. kommen die verschiedenen Allele im untersuchten Material etwa gleich häufig vor oder gibt es viele nur selten auftretende Allele?

In die Kategorie "gut" fielen 41 (27%) der ursprünglich 150 untersuchten funktionalen Mikrosatellitenmarker und in die Kategorie "brauchbar" 43 Marker (29%). Die anderen 66 Primerkombinationen (44%) waren bereits bei der Testung (siehe oben) als nicht nutzbar bewertet worden. Über 20 dieser für die Genotypisierung nicht nutzbaren Marker können aber für die genetische Kartierung verwendet werden.

Tabelle 1: Liste der untersuchten Rosensorten.

fortlaufende Nummer	Code	Sortenname	Laborkürzel
1	3774	Ulrike	01ULR
2	7062	Sommerliebe	02SOM
3	6982	Spreeglut	03SPR
4	3400	Sappho	04SAP
5	3296	Viridiflora	05VIR
6	5488	Kaiserin Auguste Victoria	06KAI
7	1740	Lady Susan Birch	07LAD
8	4737	Comtesse de Murinais	08COM
9	3963	Zoe	09ZOE
10	4934	Alexandre Dupont	10ALE
11	1431	Ibica	11IBI
12	4437	Dr. Georges Martin	12GEO
13	3960	Zizi	13ZIZ
14	3735	Toni Lander	14TON
15	3162	Signet	15SIG
16	7008	Una	16UNA
17	133	Spes	17SPE
18		Canary Bird	18CAN
19	6120	Mme. Alfred Carriere	19ALF
20	6650	Jan Spek	20.01.02
21	3633	Super Congo	21SUP
22	109	Minette	22MIN
23	2037	Marjorie le Grice	23MAR
24	3969	Pardinas Bonet	24PAR
25	6040	Sangerhausen	25SAN
26	5234	Abraham Zimmermann	26ABR
27		Nida Senf	27NID
28		Lovania	28LOV
29	3346	Autumn	29AUT
30	791	Bertram Park	30BER
31		Lichtblick	31LIC
32		Rosa multiflora thunb. (Japan)	32JAP

Tabelle 2: Datenblatt für Mikrosatellitenmarker RMS059. Spalten bezeichnen verschiedene Allele des Markers in Basenpaaren (bp), Zeilen bezeichnen die 32 verschiedenen Rosensorten; eine 1 steht für Anwesenheit, eine 0 für Abwesenheit eines Allels in der untersuchten Sorte. Die letzte Zeile gibt an, wie oft ein Allel im untersuchten Material beobachtet wurde. Die letzte Spalte enthält die Zahl der Allele in einer Sorte. RMS059 enthält einen Mikrosatelliten mit den dinukleotiden Wiederholungsmotiven AT und GT und zeigt daher Allele mit einem Größenunterschied von 2 bp (mit Ausnahme des größten Allels).

Sorten	121	123	125	127	129	133	137	139	144	
01ULR	1	0	0	1	1	0	0	0	1	4
02SOM	0	1	0	1	1	0	0	0	0	3
03SPR	0	0	0	1	1	0	0	0	1	3
04SAP	0	1	0	1	0	0	0	0	0	2
05VIR	1	0	0	1	0	0	0	0	0	2
06KAI	0	1	0	1	1	0	0	0	0	3
07LAD	0	1	0	1	1	0	0	0	0	3
08COM	0	1	0	0	0	0	1	0	0	2
09ZOE	0	1	0	0	0	0	1	0	0	2
10ALE	1	1	0	0	0	0	0	0	1	3
11IBI	1	1	0	1	1	0	0	0	0	4
12GEO	1	0	0	1	1	0	0	0	1	4
13ZIZ	1	1	0	0	0	0	0	0	0	2
14TON	1	0	0	1	1	0	0	0	1	4
15SIG	0	0	0	1	1	0	0	0	1	3
16UNA	0	1	1	1	0	0	0	0	0	3
17SPE	0	1	0	1	1	0	0	0	0	3
18CAN	0	0	1	0	1	0	0	1	0	3
19ALF	1	0	0	1	0	0	1	0	0	3
20JAN	1	0	0	1	1	0	0	0	0	3
21SUP	0	0	0	1	1	0	0	0	1	3
22MIN	0	1	0	0	1	1	1	0	0	4
23MAR	1	0	0	1	1	0	0	0	1	4
24PAR	0	0	0	0	1	0	0	0	1	2
25SAN	1	1	0	0	0	0	0	0	1	3
26ABR	1	0	0	0	1	0	0	0	1	3
27NID	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
28LOV	1	0	0	1	0	0	0	0	1	3
29AUT	1	0	0	1	0	0	0	0	0	2
30BER	1	0	0	1	0	0	0	0	0	2
31LIC	1	0	0	1	1	0	0	0	1	4
32JAP	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	18	13	2	21	18	1	4	1	13	

Ergebnisse der Genotypisierung

Im Vergleich zu anderen Kulturpflanzen wie z.B. Weizen, Raps oder Zuckerrübe zeigt Rose eine hohe durchschnittliche Anzahl von Allelen pro Sorte (letzte Spalte in Tabelle 2), eine hohe Zahl von verschiedenen Allelen pro Mikrosatellitenmarker und relativ wenige Nullallele. Das spiegelt die Heterogenität des untersuchten genetischen Materials und die komplexe Genetik von Rose wider.

Die Ergebnisse der Genotypisierung wurden für eine Verwandtschaftsanalyse der untersuchten Rosensorten über das Programm NTSYS verwendet. Dabei wurden einmal nur die mit den 41 "guten" Markern erzeugten Daten und einmal die mit allen 84 "brauchbaren" Markern erzeugten Daten verrechnet. Die Ergebnisse sind in Form von Stammbäumen in Abbildung 3 und 4 dargestellt. Auf der horizontalen Achse ist jeweils die genetische Distanz angegeben, die zwischen den theoretischen Werten 0 (keine genetische Verwandtschaft) und 1,00 (Übereinstimmung aller untersuchten Markerdaten) liegt. Beide Dendrogramme unterscheiden sich im Wesentlichen nur in der oberen Hälfte, wo Verzweigungen in sehr kurzen Abständen aufeinander folgen. Die Verwandtschaftsbeziehungen in der unteren Hälfte stellen sich bei Verwendung von 41 oder 84 Markern relativ gut übereinstimmend dar.

Das Ziel der Untersuchung, die eindeutige Unterscheidung aller untersuchten Sorten mit Hilfe von Mikrosatellitenmarkern, wurde damit erreicht. Für jede der Sorten existiert nun ein genetischer Fingerabdruck, der mit dem anderer Sorten verglichen werden kann. Je mehr Markerdaten zwischen zwei Sorten übereinstimmen, desto näher sind sie im Dendrogramm benachbart. Die Ergebnisse der durchgeführten Analyse können daher nicht nur zur Unterscheidung von Sorten verwendet werden, sondern auch Verwandtschaften und Züchtungswege offenlegen.

Unter Nutzung der Information, die im Internet zugänglich ist (z.B. www.everyrose.com, www.rogersroses.com), konnte im Dendrogramm von unten nach oben eine grobe Tendenz von Wildarten über alte Sorten zu moderneren Sorten festgestellt werden. Die ganz unten stehende Art *Rosa multiflora* zeigt übereinstimmend in beiden Analysen eine geringe Verwandtschaft von nur 0,22 zu allen anderen untersuchten Sorten.

Auch die Art *Rosa xanthina* mit der Sorte 'Canary Bird' ist kaum mit den übrigen Sorten

verwandt. Die Moosrosen 'Zoé' und 'Comtesse de Murinais' entstanden 1861 bzw. 1843. Die weiter oben stehenden Remontant-Hybriden 'Abraham Zimmermann' (1876) und 'Dr. Georges Martin' (1908) stammen aus der 2. Hälfte des 19. Jahrhunderts bzw. aus dem frühen 20. Jahrhundert. Die relativ junge Teehybriden 'Autumn' (1928), 'Sommerliebe' (1988) und 'Spes' (1970) stehen in der oberen Hälfte des Dendrogramms. Jeweils am oberen Ende sind die beiden Floribundarosen 'Ulrike' (1973) und 'Jan Spek' (1966) zu finden. Schlecht einzuordnen sind die Sorten 'Spreeglut' (Strauchrose, 1985), 'Sangerhausen' (Polyantha-Hybride, 1938) und 'Lichtblick' (Strauchrose, 1972). Sie bilden zwar in beiden Dendrogrammen eine Gruppe, werden jedoch in Abbildung 2 eher in die Verwandtschaft der Teehybriden und in Abbildung 3 eher in die Verwandtschaft der Floribundarosen gestellt.

Definierung eines Sets von 25 Mikrosatellitenmarkern

Für die weitere Genotypisierung einer größeren Zahl von Sorten wurden aus den 41 guten Markern 25 ausgewählt, die verlässliche Ergebnisse liefern, eindeutig unterscheidbare Allele aufweisen und einen hohen Informationsgehalt haben: RMS023, RMS029, RMS038, RMS047, RMS052, RMS057, RMS059, RMS062, RMS065, RMS070, RMS077, RMS088, RMS089, RMS095, RMS097, RMS102, RMS103, RMS104, RMS112, RMS115, RMS120, RMS128, RMS139, RMS146 und RMS148.

Mit Hilfe dieses Sets sollte es möglich sein, mindestens 90% aller Rosensorten zu unterscheiden. Für eine Abstammungsanalyse z.B. zum genauen nachvollziehen von Züchtungswegen sollte aber eine größere Zahl von Markern eingesetzt werden. Generell steigt die Zuverlässigkeit solcher Analysen proportional mit der Zahl der verwendeten Marker (zumindest im Bereich von unter 100 verwendeten Markern).

Das Ziel der Erfindung, die Entwicklung von mindestens 25 für die Genotypisierung geeigneten Mikrosatellitenmarkern, ist erreicht worden. Insgesamt wurden 84 nutzbare Mikrosatellitenmarker entwickelt, von denen 41 besonders gut einsetzbar sind. Ein Set von 25 Mikrosatellitenmarkern wurde definiert, mit dem eine verlässliche Genotypisierung von weiteren Rosensorten durchgeführt werden kann. Die wichtigsten Angaben und Nutzungshinweise für den Gebrauch der Marker sind in der erstellten Datenbank enthalten.

Nähere Beschreibung der Mikrosatellitenmarker

Die nähere Beschreibung der Mikrosatellitenmarker wird in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle: Beschreibung der Mikrosatellitenmarker

Marker-name	Motiv	Bewertung	Primer 1 (F), 5' -> 3'	Primer 2 (R), 5' -> 3'	Markierung	Temperatur-optimum	Anwendung	Kommentar	erwartete Produktgröße (bp)	Größenbereich, untere Grenze	Größenbereich, obere Grenze	durchschnittliche Allel-anzahl pro Sorte
RMS001	GT&GC	brauchbar	TTCAAAATTGC TGCCCCCTTAG	TACCAGTTGAGT GAGAAATAGTT	HEX	55	Genotypisierung & Kartierung	unterschiedlich starke Allele; unzuverlässige Amplifikation	242	220	250	4
RMS002	GA	nicht nutzbar	AATAATTTTCT TTTGGTA	GATTGGTTTTCAC TATTCA	FLU	x	keine	keine Amplifikation	138			
RMS003	GA	brauchbar	TGGGAAGGGA AAGCAACA	AAGGTAGGCAGA AGTGACAGACAT	ROX	60	Genotypisierung & Kartierung	Schattenpeaks und echte Peaks v.a. im vorderen Bereich schwer zu unterscheiden; Peaks >170 bp schwach	151	130	190	3
RMS004	GT&AT	nicht nutzbar	CAGGCCAAGG AAGAGGTAAGT AAA	CGTATGCGCGTG TAGGAAGG	FLU	x	keine	unspezifische Amplifikation	143			
RMS005	GA	nicht nutzbar	CTACCGGTGAC CAGTGACGA	ATTTGCCCTCT CCCTTTGT	FLU	x	keine	keine Amplifikation	143			
RMS006	GT&GA	nicht nutzbar	ACCGGTCTCAT CTTCCATTG	GTAGGTCGGTCC GTCTGTCA	FLU	x	keine	keine Amplifikation	114			
RMS007	GA	nicht nutzbar	TCTTCCGACT CCGACAA	TATGCCATTTCAG ACTCTCCAACAC	ROX	x	keine	Fragmente polymorph, aber z.T. unter 74 bp, deshalb am ABI nicht auswertbar	171	30	180	2
RMS008	GA	brauchbar	TCTCTGCGACA AAAACAAACAC T	CCATGAAGCGGC GGAGAGGA	ROX	65	Genotypisierung & Kartierung	Schattenpeaks z.T. schwer von Allelpeaks zu unterscheiden, v.a. im vorderen Bereich; 1 bp-Unterschiede	176	140	200	4
RMS009	CT>	nicht nutzbar	ATTGGCAAAAG ATTCTCTAC	ACTTGGTAATTTC GAGCATAA	FLU	x	keine	unspezifische Amplifikation	145			
RMS010	GA	nicht nutzbar	GGTTGGGGGA AATTGAAGCAG AGA	TCTTTTCTTCTAC AAACCCCAACCA AC	FLU	x	keine	unspezifische Amplifikation	105			
RMS011	GT	brauchbar	TAGAAACGACC AATAAAAGAGG	TAACGAAACATC ATCAATAGCA	ROX	55	Genotypisierung & Kartierung	starker fast monomorpher Peak, daneben seltene Allele, unzuverlässige Amplifikation; 10 bp-Allel sehr schwach	190	170	290	1

Tabelle: Beschreibung der Mikrosatellitenmarker

Marker-name	Motiv	Bewertung	Primer 1 (F), 5' -> 3'	Primer 2 (R), 5' -> 3'	Markierung	Temperatur-optimum	Anwendung	Kommentar	erwartete Produktgröße (bp)	Größenbereich, untere Grenze	Größenbereich, obere Grenze	durchschnittliche Allel-anzahl pro Sorte
RMS012	GT	nicht nutzbar	ATAGAAAAATA GAGGGGGTGT G	GATCGAAAAGTG GTCAAAATA	FLU	60	Kartierung	Neigung zu unspezifischer Amplifikation	141	100	200	4
RMS013	GA	nicht nutzbar	GCCTTAGCCG GGGTTTCAA	GATCAATACCGA ACTAACAAG	HEX	60	Kartierung	Stotterbanden	208	150	220	1
RMS014	GA	nicht nutzbar	TATCTTTCTTC CCACCGACGA C	CCTCACTGCCTG CCCAACTGT	FLU	55	keine	nicht reproduzierbarer p/a-Polymorphismus	124	240	300	1
RMS015	GA	brauchbar	TAATGTAGGCA GATATAAGGA GT	GCAGCTGCACAA CAAGGAA	ROX	55	Genotypisierung & Kartierung	unterschiedlich starke Allele	185	120	230	3
RMS016	GA	nicht nutzbar	GGCCTGGACC TTTCTCATTG	AACCGCTGCTGC TTTCATTTT	FLU	x	keine	unspezifische Amplifikation	121			
RMS017	AT & GT	brauchbar	AGGTCCCGTTA TTTCAGG	AGTTGGCTTATG GCTTTTT	HEX	55	Genotypisierung & Kartierung	"Igel" bei ca. 180 bp, große Allele relativ schwach	246	200	270	3
RMS018	GT	nicht nutzbar	TTTTGGTGGG TAAGTTT	TTGGCCAATAAG GAAGACA	FLU	x	keine	keine Amplifikation	125			
RMS019	GA	nicht nutzbar	ACCGTTCCAT TACCCTTTCAC C	CGTCGGCCCATGg AttTTGTA	FLU	x	keine	keine Amplifikation	104			
RMS020	GA	nicht nutzbar	AGCGGCCCAT GCAAAATCAA	TTCTTAACGCAA ACTATGTAAAT	HEX	x	keine	monomorph mit schlecht reproduzierbarer Amplifikation -> evtl. als Sensor für DNA-Menge und -Qualität geeignet	239	220	260	1
RMS021	GA	nicht nutzbar	AATTCCTCTT ACCCAAACAC	CCGGCGAAGTCC CCTATG	ROX	x	keine	zu schwache Amplifikation	188			
RMS022	GA	nicht nutzbar	AAGAAGATAAA TTAGGGGGAAA AA	GCGCGAACATAT gATTGGT	ROX	x	keine	keine Amplifikation	170			
RMS023	GT	gut	TTTGCATTAAAT TACAGATGAA	TAAACAATATAAA TGGGGGAGTAAA T	ROX	50	Genotypisierung &		170	140	190	2

Tabelle: Beschreibung der Mikrosatellitenmarker

Marker-name	Motiv	Bewertung	Primer 1 (F), 5' -> 3'	Primer 2 (R), 5' -> 3'	Markierung	Temperatur- optimum	Anwendung	Kommentar	erwartete Produkt- größe (bp)	Größen- bereich, untere Grenze	Größen- bereich, obere Grenze	durchschnittliche Allel- anzahl pro Sorte
							Kartierung					
RMS024	AT>	brauchbar	ACTACTGTAAA ATATGAAAAAT CC	GTAGTAGCGGTT GCAAGAAAAATA	HEX	55	Genotypisierung & Kartierung	Allele verschieden stark: Allele >200 bp meist schwach; nicht gut, aber reproduzierbar	200	170	250	3
RMS025	AT / GT	nicht nutzbar	TAATGTAAGCT AACTAATCT	TTTTAAATTTTCG GTGGAGA	ROX	x	keine	keine Amplifikation	167			
RMS026	GT	nicht nutzbar	ATAGATATGTT TGGGTTCA	AATGTCAGGTTT TGTTATG	FLU	x	keine	schwache und unzuverlässige Amplifikation	129			
RMS027	AT>	gut	ACCGTTGTGCT TATCAGGA	ATTGGTGGTGCT TTTACATTAC	ROX	55	Genotypisierung & Kartierung	Peaks >160 bp z.T. sehr schwach; Schattenpeaks im vorderen Bereich	189	120	200	3
RMS028	AT>	nicht nutzbar	TAGGCAAGACC ATGaACCAG	TGTGCcTGTTG CTTGTA	HEX	x	keine	unspezifische Amplifikation	237			
RMS029	GA	gut	GGATAAAACCA ACGGGACAGA CTC	TCCGACACCATC CCTCCTACATAA	HEX	65	Genotypisierung & Kartierung	1 bp-Unterschiede zwischen den Allelen	201	190	230	3
RMS030	GA	brauchbar	GATAAATTTCA AGCGGAGAG	AAAAGATGAACG ACCCAAATAAT	HEX	55	Genotypisierung & Kartierung	einige Linien mit 7 Peaks, sonst nur 1-2 Peaks	201	150	210	2
RMS031	GA	nicht nutzbar	TATATTAAAGA ACAAGTGAGAA C	GTGGCTATCGAA AAACAA	HEX	x	keine	zu schwache Amplifikation	202			
RMS032	AT>	nicht nutzbar	AGAAACCAACC TTAGCAT	AACCATCCATATT TCAGTCA	ROX	x	keine	zu schwache Amplifikation	193			
RMS033	GA	nicht nutzbar	CAAGAGATGTC GGAAGAGCagG AAGT	TGCACACCCAAA TTTACAAACCAC A	HEX	60	Kartierung	Stotterbanden, Allele nicht eindeutig ansprechbar	203	160	240	4
RMS034	GA	brauchbar	GCTTCTCGGTC	CTCCCGCTCAAA	FLU	60	Geno-	Stotterbanden	136	110	190	3

Tabelle: Beschreibung der Mikrosatellitenmarker

Marker-name	Motiv	Bewertung	Primer 1 (F), 5' → 3'	Primer 2 (R), 5' → 3'	Markierung	Temperatur-optimum	Anwendung	Kommentar	erwartete Produktgröße (bp)	Größenbereich, untere Grenze	Größenbereich, obere Grenze	durchschnittliche Allel-anzahl pro Sorte
			TCGTGCTCTC	TCAATAAATCTC			typisierung & Kartierung					
RMS035	GA	brauchbar	CCTCCTTGGCA GCCCTTTTCATT	ATCGGCTATCCA CATCGTCTACAC	HEX	55	Genotypisierung & Kartierung	Stotterbanden	229	180	250	4
RMS036	GA	nicht nutzbar	CTCGCGGGCCC AAATAACAAT	TGCCCCCTTACATT TTCTCTACTCCAT A	HEX	x	keine	zu schwache Amplifikation	235			
RMS037	GA	gut	AACCTCGGAGC CGCATTTCAC	AGTTTTCCTCGC CAGATAAGC	HEX	60	Genotypisierung & Kartierung	unterschiedlich starke Allele	228	180	240	4
RMS038	GA	gut	GTGATAAGAGC AAAACAAGATG G	CTCGCGGAAGCC TCAAAA	FLU	55	Genotypisierung & Kartierung	Allele >150 bp stottern und sind relativ schwach	115	100	180	3
RMS039	2xG A	brauchbar	GCTGCTTTTCTC CAATCAACAA	CAGCTCAGCAAA GGGGACTA	FLU	60	Genotypisierung & Kartierung	Stotterbanden, 1 bp-Unterschiede	124	80	150	4
RMS040	GT	nicht nutzbar	AACCCCAAACT TCCTAAACT	TCTGTATCTACT GTGGCTAACC	FLU	55	Kartierung	zu starkes Stottern	143	130	160	2
RMS041	GA	nicht nutzbar	TTAACCCCAAAAG CACCAAAAT	ACCTTCACCCGAT GTATCACC	HEX	55	keine	zu unspezifische Stotterpeaks	249			
RMS042	AT& GT	brauchbar	GCATGGCCAG GCTCTTCAC	ATGCCAAACGTC TCAGTCAACC	ROX	60	Genotypisierung & Kartierung	Neigung zu Unspezifität, nur im Bereich 180 bis 272 bp auswerten (evtl. nur <200 bp)	181	170	300	3
RMS043	GA	brauchbar	GATCAAAAGATG	AGGGGAATCTTT	HEX	60	Geno-	Stotterbanden	215	200	240	3

Tabelle: Beschreibung der Mikrosatellitenmarker

Marker-name	Motiv	Bewertung	Primer 1 (F), 5' -> 3'	Primer 2 (R), 5' -> 3'	Markierung	Temperatur-optimum	Anwendung	Kommentar	erwartete Produktgröße (bp)	Größenbereich, untere Grenze	Größenbereich, obere Grenze	durchschnittliche Allel-anzahl pro Sorte
			GGTTCCTCTCT C	GAAAGTCGTTC			typisierung & Kartierung					
RMS044	AT	brauchbar	ACCGATGGATG GCAATAAC	ATACAGGACATA AACGGCTACC	HEX	55	Genotypisierung & Kartierung	schlechte Reproduzierbarkeit; Amplifikation evtl. stark abhängig von DNA-Menge oder -Qualität	204	190	220	2
RMS045	AT & GT & AT & GA	brauchbar	GAAaaTAAGGA CATCATCTAC	GGTGCCTCCATT ATTTAC	HEX	55	Genotypisierung & Kartierung	Stoßerbanden, dadurch sind Heterozygote mit 2 bp-Unterschieden schwer auszuwerten; zusätzliche schwache Allele	233	150	240	2
RMS046	AT & GT	brauchbar	AAAGGATTGCT GGATGTG	TATTCGCGTGGA CTCTAT	HEX	55	Genotypisierung & Kartierung	p/a-Polymorphismus des 248 bp-Allels (genomspezifischer Marker?); empfindlich für DNA-Kontaminationen	247	200	260	1
RMS047	GA	gut	GCTCCCTCAAT TTCCACTCA	aCCAACCCCAATT CGCTCAT	FLU	60	Genotypisierung & Kartierung	74 bp-Peak läßt sich nicht immer markieren	98	70	110	3
RMS048	GA & AT	nicht nutzbar	ATAAGTATGAA AAAGTAAAAATG AT	GTATACTAGAAA AACAAAACTGGT	ROX	x	keine	zu schwache Amplifikation	197			
RMS049	AT & GT	nicht nutzbar	AAAAATACAAC CGAAAAA	CCAACCCGTCAA GGCTAAA	ROX	x	keine	zu schwache Amplifikation	178			
RMS050	AT & GA	brauchbar	TAAGCCTAAGA AAAACCTCATT	CAGCCGTCAGAT TCACCTG	ROX	50	Genotypisierung & Kartierung	amplifiziert sehr schwach, zeigt nur p/a-Polymorphismus des 177 bp-Allels mit einer Ausnahme: 21SUP hat 175 bp-Allel	169	140	250	1
RMS051	GT	brauchbar	AGTAGACTGTC CTCCATTAGC	ATACCATCAGAG AAGAGACGACAC	HEX	55	Genotypisierung & Kartierung	wenig Polymorphismus, Linien mit Nullallelen zeigen einen nicht immer	215	160	240	1

Tabelle: Beschreibung der Mikrosatellitenmarker

Marker-name	Motiv	Bewertung	Primer 1 (F), 5' -> 3'	Primer 2 (R), 5' -> 3'	Markierung	Temperatur-optimum	Anwendung	Kommentar	erwartete Produktgröße (bp)	Größenbereich, untere Grenze	Größenbereich, obere Grenze	durchschnittliche Allel-anzahl pro Sorte
							Kartierung	reproduzierbaren 169 bp-Peak				
RMS052	GA	gut	TTAGCCGTTAA TTGAGTCGACA ACCTC	TGATGAACCCAA TAGAATGAAAAC AGA	HEX	60	Genotypisierung & Kartierung	trotz Stotterbanden gut auswertbar	224	160	250	3
RMS053	GA	nicht nutzbar	GCGGTAGCT AGTGACTGGAA TCT	CCCTTACCCTTAC cCCTTTGTTAC	ROX	65	keine	unspezifische Amplifikation	160			
RMS054	AT&GA	brauchbar	CTGGGAGGAG AACTcTgTCA	TAGCTTATTAGTC TGCATTGATGA	HEX	50	Genotypisierung & Kartierung	241 bp-Allel schwach, wenn kleineres Allel vorhanden	239	190	250	1
RMS055	GA	brauchbar	TGATCACAAGA GCTTTTCAAGT TTAg	AGTTAGGCGCAT GTACAAGAAAAT	ROX	55	Genotypisierung & Kartierung	komplexes Muster	192	180	220	4
RMS056	GA	nicht nutzbar	TGTGTAGATTG GCATTCC	GATCTAGGATGA TTCAATA	FLU	50	Kartierung	Doppel- und Dreifachpeaks nicht auswertbar	133	110	170	3
RMS057	GAA / GA	gut	CGAGGTGGGT AAGGGCGAaca AAG	CCCATCCAAAGC GAGACGACGAC	ROX	60	Genotypisierung & Kartierung	viele 1 bp-Unterschiede, die aber reproduzierbar sind	174	150	200	3
RMS058	GT	gut	cAACCCCTGAA GCCTGAA	TTTGTAACCCATT TGACCATA	FLU	55	Genotypisierung & Kartierung	z.T. sehr starke Amplifikation, dadurch auch starke Schattenpeaks; große Allele schwach	143	120	200	3
RMS059	AT>	gut	ACAGTCTTATA GTGGCTTCC	TACAGGGTTCTA ATTGATACATAC	FLU	55	Genotypisierung & Kartierung	Allele >130 sind manchmal relativ schwach	126	110	150	3

Tabelle: Beschreibung der Mikrosatellitenmarker

Marker-name	Motiv	Bewertung	Primer 1 (F), 5' → 3'	Primer 2 (R), 5' → 3'	Markierung	Temperatur-optimum	Anwendung	Kommentar	erwartete Produktgröße (bp)	Größenbereich, untere Grenze	Größenbereich, obere Grenze	durchschnittliche Allel-anzahl pro Sorte
RMS060	GA	brauchbar	CATTCATTGA CTCTAAGGA	TATTCTGGTCTAA GCTATTGTAA	HEX	50	Genotypisierung & Kartierung	schwach und unzuverlässig, aber evtl. genomspezifisch	219	205	260	2
RMS061	GT	brauchbar	ATATCAGCCCGT CCCATCAG	TTAGAAAAATCCC AAACAT	HEX	50	Genotypisierung & Kartierung	gut reproduzierbare Nullallele, evtl. genomspezifisch	211	190	240	1
RMS062	GA & GT	gut	GCGAACGGCA TTTACTTGT	GGTTGTTCTGGG TGGTTTTT	ROX	55	Genotypisierung & Kartierung	1 bp-Unterschiede	189	150	200	4
RMS063	GAA	gut	CCACCGCCCA CAATCACAATG	GCTCTGCGGAGT GGGAATGGT	FLU	60	Genotypisierung & Kartierung	zwei Allele < 80 bp; Schattenpeaks und Allele im Bereich um 80 bp überlagernd	90	60	100	2
RMS064	GA, GT	nicht nutzbar	TTTTTGCAATAT GTGAAGC	GATTGGTCAACC GATATGTAGAA	HEX	50	keine	unspezifische Amplifikation	227			
RMS065	GA	gut	TATAGCTCGGT AGATTCAAA	CCAGACTGCCCC CAACTCATA	FLU	55	Genotypisierung & Kartierung	viele 1 bp-Unterschiede, die aber reproduzierbar sind	111	90	150	3
RMS066	GA	gut	TCCACCCACAG ACCACAG	AAGCTCCCTACG ATTTCACCTC	ROX	60	Genotypisierung & Kartierung	Schattenpeaks und Allele schwer unterscheidbar, 1 bp-Unterschiede	198	170	220	3
RMS067	GA	nicht nutzbar	CAATCTGCAAT CCGAATCC	ATGGTGAAAAAC AGAAATACTACA	ROX	x	keine	zu schwache Amplifikation	169			
RMS068	GA	nicht nutzbar	GTGCGCTTTCT GCTCCATT	CATTITGTCCTAC GTTTCACCTC	ROX	x	keine	keine Amplifikation	199			
RMS069	GT & GA	nicht nutzbar	TCGGAGATTAA GAGTGAGGTgA	GTGCCCACCTTAC CCAAACCATC	HEX	65	Kartierung	starke Stotterbanden; "Igel" bei 235 bp	232	170	250	1

Tabelle: Beschreibung der Mikrosatellitenmarker

Marker-name	Motiv	Bewertung	Primer 1 (F), 5' -> 3'	Primer 2 (R), 5' -> 3'	Markierung	Temperatur-optimum	Anwendung	Kommentar	erwartete Produktgröße (bp)	Größenbereich, untere Grenze	Größenbereich, obere Grenze	durchschnittliche Allel-anzahl pro Sorte
			GT									
RMS070	GA	gut	TGCCTCTCGAT ACAAACC	AATAAGAACC TACCCCGAAGAG	ROX	50	Genotypisierung & Kartierung	sehr gute, von der DNA-Qualität relativ unabhängige Amplifikation, keine Ausfälle oder Nullallele, 158 bp- und 177 bp-Allel z.T. unsicher anzusprechen (Vorpeak zu größerem Fragment oder eigenes Allel?)	173	150	200	3
RMS071	GT	brauchbar	GTTAGCATCTG GCACATTAT	AGTTCCTTGACC AGCAGAG	FLU	55	Genotypisierung & Kartierung	verschieden starke Allele, Allele nur z.T. reproduzierbar zwischen 55 und 60°C	90	80	150	2
RMS072	GA	gut	TTAGCTCAAGA ATTGATCAAG	TCCAAACCGAGC TAAGAAAACT	FLU	55	Genotypisierung & Kartierung	bei starker Amplifikation Doppelpeaks (letzter Peak ist der "echte"); schwache Peaks nicht ausgewertet	110	90	120	1
RMS073	AT& GT/ GAA	brauchbar	AAACCCCTTTTA TGAGAGAGTAG	TAAACATGAAAT TATAACAATAGT G	ROX	50	Genotypisierung & Kartierung	Nullallele und schwache Amplifikation kaum unterscheidbar	156	150	180	1
RMS074	AT& GT	nicht nutzbar	GCTTCTATCCA CAGTTTCACCT C	TTCATGTCAACG CTTCTGTAATAG	HEX	x	keine	zu schwache Amplifikation	237			
RMS075	AT& GT	nicht nutzbar	GCCCGTAAAG CCCGTAA	TTGGTCAACCGA TATGTAGAT	HEX	x	keine	unspezifische Amplifikation	237			
RMS076	GA	nicht nutzbar	TGGATGCAAC ACCTACAAA	CGTCGCCGGCAT TCGTC	ROX	x	keine	keine Amplifikation	180			
RMS077	GA& GT	gut	AGGTGAACATG GGCCAACTA	TCAAAGAATGAG TGCCTACTAAGA	ROX	60	Genotypisierung & Kartierung	kleinere Allele schwächer	154	130	180	1
RMS078	GT	brauchbar	CCATTCCAAAG TTGCACGTA	CTCTACTGCCAG CAACCACA	FLU	60	Genotypisierung	unzuverlässige Amplifikation, evtl. DNA-	112	100	140	2

Tabelle: Beschreibung der Mikrosatellitenmarker

Marker-name	Motiv	Bewertung	Primer 1 (F), 5' -> 3'	Primer 2 (R), 5' -> 3'	Markierung	Temperatur-optimum	Anwendung	Kommentar	erwartete Produktgröße (bp)	Größenbereich, untere Grenze	Größenbereich, obere Grenze	durchschnittliche Allel-anzahl pro Sorte
							rung & Kartierung	qualitätsabhängig; Nullallele, schwache Allele, Überschneidungen von Vorpeaks und Allelen				
RMS079	GA	brauchbar	CCGGTATGGA GAGGAATGAG	GCAATTATCCTT GACAGAACCC	ROX	60	Genotypisierung & Kartierung	sehr schöne Allelleiter, aber durch Stotterbanden und schwache Peaks schwierige Auswertung	182	160	210	2
RMS080	GT	brauchbar	GCTTTCAAAGA TGGGAACCT	TGGTATCACATT TACTCTCATTCG	HEX	60	Genotypisierung & Kartierung	verschieden starke Allele	213	180	230	3
RMS081	GT & GA	nicht nutzbar	TTTGACACACA CACACAAACAT	GACTGAGAAACA AGTCCGTCCT	ROX	60	Kartierung	Stotterpeaks, verschieden starke Allele	164	110	180	2
RMS082	2xGA	brauchbar	AACAACACACG CGGAATATG	TGCAGTTGGAGT TGGAGTTG	FLU	55	Genotypisierung & Kartierung	starke Schattenpeaks	113	90	150	1
RMS083	GT	nicht nutzbar	GACGTCCGCA CTTAGCAAC	AGGTCCACGCA TAGACGGC	FLU	x	keine	unspezifische Amplifikation	90			
RMS084	GT	gut	GGGAGTCTCAA GAGCTACCGT	CTTCATGTAAGC CACTGGACA	ROX	60	Genotypisierung & Kartierung	nur Fragmente <200 bp auswerten; 181/183 bp-Doppelpeaks schwer zu interpretieren	185	160	210	3
RMS085	GA	nicht nutzbar	ATGCCCATGAC TATCTTGCC	TCCAAGATGAAG AATTGCGG	HEX	x	keine	unspezifische Amplifikation	204			
RMS086	GA	brauchbar	TTCTGTTTCATC TGGCCTCC	GTTCTGATAGTTT AGGTCGGC	FLU	55	Genotypisierung & Kartierung	unzuverlässig, schwer auszuwerten, stottert stark	150	120	170	2
RMS087	GA	nicht nutzbar	GCCCAACTATT CCTCCCACT	CCCACAGTTGTC CAACACAA	HEX	x	keine	zu schwache Amplifikation	229			
RMS088	GA	gut	TCCTGATTCTGT	GAAGGCCTCAAG	HEX	65	Genotypisierung	gleichmäßig starke	207	180	220	3

Tabelle: Beschneldung der Mikrosatellitenmarker

Marker- name	Motiv	Bewertung	Primer 1 (F), 5' -> 3'	Primer 2 (R), 5' -> 3'	Markie- rung	Tempe- ratur- opti- mum	Anwen- dung	Kommentar	erwart- ete Produ- kt- größe (bp)	Größen- bereich, untere Grenze	Größen- bereich, obere Grenze	durch- schnitt- liche Allel- anzahl pro Sorte
			ATcATCCACTG	GTTCCTCT			typisie- rung & Kartie- rung	Amplifikation				
RMS089	AT & GT	gut	TTC TTATTGTTG GTTTGAAGAA A	TCAATAGTGAGG TGCGAGGA	ROX	55	Geno- typisie- rung & Kartie- rung	verlässlich amplifizierender Marker mit 1 bp- Polymorphismen; Heterozygote im Bereich 167-168-169 bp schwer anzusprechen	161	150	190	3
RMS090	GT & GC	gut	TGTGTGTGATC CATGGCCT	ATCTGCAATGAC AATGGCAA	HEX	60	Geno- typisie- rung & Kartie- rung	Nullallele, einige schwach amplifizierende Linten	204	150	220	2
RMS091	GA & GT	brauchbar	gAtcAGGGTgAat ACCGAGC	gCCACTCTTCTCT GTCCTCAA	HEX	55	Geno- typisie- rung & Kartie- rung	Stotterbanden, unterschiedlich starke Allele	207	190	270	2
RMS092	AT & GT	nicht nutzbar	TGAAATGAGAG ACCAATTCCAA	ATCAAGTGAGCC GATGGAG	HEX	x	keine	unspezifische Amplifikation	208			
RMS093	GA	nicht nutzbar	cGTTCTCGTTG TTGtCAICG	CCCtCTCTCTCC AGTCACGA	FLU	60	Kartie- rung	unspezifische Amplifikation	116	80	210	3
RMS094	GA	brauchbar	TCCTATCCACA CCGACATCA	TCACAAATACCTT CCAGTCGC	ROX	60	G Geno- typisie- rung & Kartie- rung	verschieden starke Doppelpeaks schwer anzusprechen	175	150	190	3
RMS095	GA	gut	CCAATCTCCTC AACTCCCAG	TCAGGGCTTCTA AAGCTTGC	ROX	60	Geno- typisie- rung & Kartie- rung	Doppelpeaks (ersten Peak auswerten)	163	130	190	3
RMS096	AT & GT & AT	nicht nutzbar	TGACCAATATG ACAGAGAACCA A	TGATAGCCTTAC ATATGGAACAT T	HEX	x	keine	keine Amplifikation	203			
RMS097	GA &	gut	ATCTGGCTGAA	CATGCTAACTCT	ROX	65	Geno- typisie- rung & Kartie- rung	Allele manchmal	163	150	190	2

Tabelle: Beschreibung der Mikrosatellitenmarker

Marker- name	Motiv	Bewertung	Primer 1 (F), 5' -> 3'	Primer 2 (R), 5' -> 3'	Markie- rung	Tempe- ratur- opti- mum	Anwen- dung	Kommentar	erwart- ete Produ- kt- größe (bp)	Größen- bereich, untere Grenze	Größen- bereich, obere Grenze	durch- schnitt- liche Allel- anzahl pro Sorte
	GT		CACCACACA	CCATGTTCCA			typisie- rung & Kartie- rung	unterschiedlich stark				
RMS098	GT / GA	gut	CACGTCCCAT CCAGAAATT	CCCTCAATGGAG AGCAAGAG	ROX	60	Geno- typisie- rung & Kartie- rung	bis auf wenige Ausnahmen monomorph	172	150	190	1
RMS099	GA	nicht nutzbar	GGTCTGGTTCC TTGAGGTGA	CTCTCTCGTCCG AAAGCATC	ROX	x	keine	unspezifische Amplifikation	166			
RMS100	GT & AT	nicht nutzbar	AGAGCTCCGCT CTGGATATG	AAGCCAAAGCTT ACGTGCAT	ROX	x	keine	keine Amplifikation	169			
RMS101	GA	nicht nutzbar	GAAGAGACTGA AAGCTTGAAgG A	CTCCTCTCCACT CCTCACCA	FLU	65	Kartie- rung	unterschiedlich starke Allele, Schattenpeaks nicht von Allelpeaks zu unterscheiden; reproduzierbar	133	110	160	3
RMS102	GT	gut	AACTAAATGGT TGAGATGCCAA A	GGAATTCGTTC CTTAAGCTAAGT T	ROX	55	Geno- typisie- rung & Kartie- rung	kleine Fragmente (bis 174 bp) oft schwächer	170	160	210	2
RMS103	GT	gut	ATTATGCCGAAC CAAACGAGG	TGGCAGCATTCT CCCTAAAC	ROX	55	Geno- typisie- rung & Kartie- rung	1 bp-Unterschiede	193	180	220	2
RMS104	GA	gut	CTAAAGCTTGA GCAAACAAATG	GGAGTATTGGCC GTAGGTGA	HEX	60	Geno- typisie- rung & Kartie- rung	weitere Peaks bei ca. 400 bp	209	160	220	1
RMS105	GT & AT	nicht nutzbar	tTgGTCTAATGC CCTATCCC	CCAGCCCTAGCC ATAATTGA	ROX	60	Kartie- rung	Stotterbanden	189	80	200	3
RMS106	GA	nicht nutzbar	CTCTCCCTCTC TGCATCAAA	CCTCTCTCTGC AACCCAAAG	ROX	55	Kartie- rung	Stotterbanden	189	150	230	3
RMS107	AT &	gut	CGACCTTgaAC	CATGAAAGTGGA	ROX	60	Geno- typisie- rung	nur zwei Hauptallele, 205	194	170	210	2

Tabelle: Beschreibung der Mikrosatellitenmarker

Marker-name	Motiv	Bewertung	Primer 1 (F), 5' -> 3'	Primer 2 (R), 5' -> 3'	Markierung	Temperatur-optimum	Anwendung	Kommentar	erwartete Produktgröße (bp)	Größenbereich, untere Grenze	Größenbereich, obere Grenze	durchschnittliche Allel-anzahl pro Sorte
	GT		TCGATGGAT	GCTAGCTAAGAA			typisierung & Kartierung	bp schwächer als 203 bp				
RMS108	GA	brauchbar	gATCGCCATGg CATGTAAAG	TTCCTCTAGTTTC CGGCTGC	ROX	55	Genotypisierung & Kartierung	schlechte Reproduzierbarkeit; Auswertung evtl. auf starke Produkte beschränken	183	150	200	1
RMS109	GT	nicht nutzbar	TGCAAACTAA ATTCCACAGAA	TGGCCTCTACAG CTCCTGTT	FLU	x	keine	unspezifische Amplifikation	115			
RMS110	GT	brauchbar	TATGAGAATGA GCGGTGCGG	TCCCTCTCATTCT CTCTCCC	ROX	60	Genotypisierung & Kartierung	schwache 207 und 211 bp-Allele schwer ansprechbar	194	180	220	2
RMS111	GA	nicht nutzbar	ttaGTCAATCATCT TCAGTTATCAA GAA	ATTCAATTGGCTT CACTGGG	FLU	x	keine	unspezifische Amplifikation	135	90	180	
RMS112	AT>	gut	CAAGGATACCA GTCGGAGAGA	AGAAATGGACAG CTCCGAAA	HEX	60	Genotypisierung & Kartierung	z.T. ungleichmäßige und unzuverlässige Amplifikation; kein reproduzierbares Nullallel	227	210	250	1
RMS113	GA	gut	CATGGATTGCG TGTCTTCTG	GGCATCAGAAAG CTGAAAGG	ROX	65	Genotypisierung & Kartierung	viele Nullallele, Stotterbanden	174	160	200	1
RMS114	GA	nicht nutzbar	AGTCGCATAAC AGGACTGGG	TGGGATTTTCGG ATAAGTCG	HEX	60	Kartierung	schwache Amplifikation, Stotterbanden, Nullallele, schlecht reproduzierbar	224	160	250	1
RMS115	GA	gut	CGTGAAGACG CAAAGTCAAA	GGAGGAGAAGG AGGATTTGTG	HEX	65	Genotypisierung & Kartierung	meist nur ein Allel pro Linie, 221 bp-Allel neben 224 bp-Allel schwer anzusprechen, einige Linien mit schwacher Amplifikation	222	200	230	2
RMS116	AT&	brauchbar	cAcCCAcTGGAA	CGACAAGCATGA	HEX	60	Geno-	viele Nullallele,	228	160	240	1

Tabelle: Beschreibung der Mikrosatellitenmarker

Marker-name	Motiv	Bewertung	Primer 1 (F), 5' -> 3'	Primer 2 (R), 5' -> 3'	Markierung	Temperatur-optimum	Anwendung	Kommentar	erwartete Produktgröße (bp)	Größenbereich, untere Grenze	Größenbereich, obere Grenze	durchschnittliche Allel-anzahl pro Sorte
	GT		tACTGGCT	CCTGAAAT			typisierung & Kartierung	Stotterbanden				
RMS117	GA	brauchbar	TCTTCTTCTCT CACCGCCAT	GGCCGATTTGTT GACCTAGA	ROX	60	Genotypisierung & Kartierung	Schattenpeaks, aber klar differenzierte Allele	199	170	230	2
RMS118	(AT&G)GT	brauchbar	TGGCTATGGGA AGAACATGA	TCAGACAAAATAA TGCGTTACCAA	ROX	60	Genotypisierung & Kartierung	Schattenpeaks	168	150	210	2
RMS119	AT>	nicht nutzbar	GCACGCACACA TATATAACAAC AA	GATATCCGCAGC CAAGAAAG	FLU	65	Kartierung	nicht reproduzierbare Peaks; z.T. <74 bp	122	50	130	2
RMS120	GT	gut	CAGTTGAAGAG AACCAAGGG	TGGTGGGTAGG GAAATGAAA	ROX	55	Genotypisierung & Kartierung	Schattenpeaks bei ca. -13 bp	193	170	210	3
RMS121	GT	nicht nutzbar	TCCTCTCCAAg ACACAATATTC AA	GCCCTCTCTGCT CTCCCTAA	FLU	55	Kartierung	Stotterbanden	94	70	130	5
RMS122	GA	brauchbar	ATCCACTTCC TCCTTCCCA	GGATTCTTTCTCT CCTGACCC	HEX	60	Genotypisierung & Kartierung	Schattenpeaks	229	190	250	3
RMS123	GA	nicht nutzbar	AAACACTCTAA GGAGGTATTCC CTAA	CGAAGTCTCCCA TGGTTTCT	ROX	x	keine	Stotterbanden	167			
RMS124	GT	nicht nutzbar	TTTGTGGTCGT GTGTGTGTAT	AGGCACAAAATAC TATCCACCTG	FLU	65	Kartierung	schwache Amplifikation, viele Ausfälle	107	80	270	2
RMS125	GA	brauchbar	AAGtgAAGACTG AGCGACCG	CTACTCCAATGT CCGCTTCC	ROX	60	Genotypisierung & Kartierung	Schattenpeaks, große Fragmente meist schwach	160	140	190	3

Tabelle: Beschreibung der Mikrosatellitenmarker

Marker-name	Motiv	Bewertung	Primer 1 (F), 5' -> 3'	Primer 2 (R), 5' -> 3'	Markierung	Temperatur-optimum	Anwendung	Kommentar	erwartete Produktgröße (bp)	Größenbereich, untere Grenze	Größenbereich, obere Grenze	durchschnittliche Allel-anzahl pro Sorte
							Kartierung					
RMS126	GT	brauchbar	AACGACCGCCT AGGAGAAA	TTGTTTCTGTTCG AATGGGT	HEX	60	Genotypisierung & Kartierung	p/a-Polymorphismus des 211 bp-Allels (genomspezifischer Marker?)	210	190	240	1
RMS127	GA	nicht nutzbar	TGCCTTCTAG ATTGCTGGA	TAGTTGTTTCGTC ACCCACCC	HEX	60	Kartierung	Stotterbanden, zu komplexes Bandenmuster	220	200	260	3
RMS128	GA	gut	AGCATCACGAG CACATTGAG	GCGAAGATTTCAC CCAATGAC	HEX	65	Genotypisierung & Kartierung		230	190	260	3
RMS129	GT	brauchbar	ACGTGCACACA CTCACACAC	ACTGATGCAGTT TGCTCTGA	HEX	60	Genotypisierung & Kartierung	verschieden starke Allele	229	220	270	2
RMS130	GA	nicht nutzbar	CAAATCAATCT GCAAAACCA	TTTGCGAATACC AGATGCAG	FLU	60	Kartierung	zu viele Fragmente (v.a. in 04SAP und 18CAN)	126	80	220	5
RMS131	GA	nicht nutzbar	CGGCCAGAGA TAACAGATGG	TGTTTGTGCTTA ACTACTACAACC TT	HEX	60	Kartierung	Stotterbanden	230	210	310	2
RMS132	GA	brauchbar	TGTGGTTATGA ATTGCTGGTG	TTCAGTTTGGTT GAATGGGAG	ROX	60	Genotypisierung & Kartierung	manchmal Schattenpeaks; große Fragmente meist schwächer	184	160	220	3
RMS133	GA	nicht nutzbar	TCTGCAACAAT CAGCAGAAGA	ATTTCTGGCAAA TCCGAATG	FLU	60	Kartierung	unspezifische Amplifikation	124	90	140	4
RMS134	GA	nicht nutzbar	TGAGCTCAAGC AATATGCAA	GGCTGTCTCTGA TTCCAGTATG	HEX	60	Kartierung	z.T. schwache und stotternde Allele	226	150	250	4
RMS135	GA	nicht nutzbar	GACCGATTGGA GAGGAATGA	TTGCCCTTCTCC CTTCTGTT	ROX	55	Genotypisierung & Kartierung	stake Intensitätsunterschiede zwischen den Allelpeaks	190	160	240	3

Tabelle: Beschreibung der Mikrosatellitenmarker

Marker-name	Motiv	Bewertung	Primer 1 (F), 5' -> 3'	Primer 2 (R), 5' -> 3'	Markierung	Temperatur-optimum	Anwendung	Kommentar	erwartete Produktgröße (bp)	Größenbereich, untere Grenze	Größenbereich, obere Grenze	durchschnittliche Allel-anzahl pro Sorte
RMS136	GA	nicht nutzbar	GATCATGAgAGt CGCCAAA	AAGAGGCAGATA TGGAGCGA	FLU	55	Kartierung	PCR bei 65°C zu unzuverlässig; bei 55°C unspezifisch	114	90	180	4
RMS137	GA	brauchbar	TGTACATGATG ATGGGACGC	GGCAATTGCAAA GACAGTCA	HEX	55	Genotypisierung & Kartierung	Stotterbanden & Vorpeaks, meist aber eindeutig auswertbar	228	210	270	3
RMS138	GA & andere	gut	CTTCTGAGAGC CACACACCA	GCAAACACATCC CATCATCA	ROX	60	Genotypisierung & Kartierung	Schattenpeaks	157	130	180	2
RMS139	GA	gut	CAAGTATCtGCT CAGGCAAGC	CCATCACATTGG GCTCTTCT	ROX	65	Genotypisierung & Kartierung	Doppelpeaks, 178 bp-Peak erscheint als Dreifach-Peak	187	170	210	2
RMS140	GT	gut	CCAATAGCGAT GCAATGAGA	TGGCTACCACT AACCTCCC	FLU	60	Genotypisierung & Kartierung	starke Vorpeaks, die aber gut identifizierbar sind; bis auf wenige Ausnahmen monomorph	123	50	140	1
RMS141	GT	nicht nutzbar	ACAGAGACTTG ACGCTGCAT	AGCGTGTGTAGC TAGGGAGC	HEX	x	keine	keine Amplifikation	202			
RMS142	2 x GA	nicht nutzbar	TGGCCTCAACG TCCTCTACC	CCTGAAATATCC CTATGTCAGAAA	ROX	60	Kartierung	zu viele Fragmente	186	160	290	8
RMS143	GA	gut	GTGGGAAGTGT GGGAACAAC	GCCTCATCCTGT CCATCTTC	HEX	65	Genotypisierung & Kartierung	schwache Peaks manchmal nicht eindeutig auswertbar	230	220	250	2
RMS144	GT	gut	TTTATCACTGT CACAAAGGCATT A	GAGCTCCATGAG GTGTTTCC	HEX	60	Genotypisierung & Kartierung	von schlechter Amplifikation ist das 199 bp-Allel stärker betroffen als das 205 bp-Allel	202	180	210	2
RMS145	2 x	gut	TGCTCACTTAC	TCCTCTCATTTTC	FLU	65	Genotypisierung	wenig polymorph, Allele	122	100	140	2

Tabelle: Beschreibung der Mikrosatellitenmarker

Marker-name	Motiv	Bewertung	Primer 1 (F), 5' -> 3'	Primer 2 (R), 5' -> 3'	Markierung	Temperatur-optimum	Anwendung	Kommentar	erwartete Produktgröße (bp)	Größenbereich, untere Grenze	Größenbereich, obere Grenze	durchschnittliche Allel-anzahl pro Sorte
	GA		CCAGAAGCC	AAGAGTAAACCC			typisierung & Kartierung	ungleich stark				
RMS146	GT	gut	ACAAGGCATTC ACCTTGGTT	TTTCTGGGCCTG CATAAATA	ROX	55	Genotypisierung & Kartierung	gut reproduzierbare Peaks, manchmal zusätzliche Stotterbanden im Bereich 160-175 bp, große Allele meist schwächer	186	150	210	3
RMS147	AT & GT	brauchbar	CCAATCTCAAT AACACCGAGC	TCTTTGTGCTGC TAATGCTCA	ROX	55	Genotypisierung & Kartierung	1 bp-Unterschiede im hinteren Bereich kaum auswertbar, insbesondere bei Heterozygoten	191	140	220	3
RMS148	GT	gut	TTTAGCAGGCA TTGGCACTAT	ACCTCCAGCACC AACTCCT	HEX	65	Genotypisierung & Kartierung	einige schwache Peaks >240 bp nicht ausgewertet	230	210	250	2
RMS149	AT & GT & AT	nicht nutzbar	CGGTGTGTAGT tGATTCGGA	TCAAATTCCTGGC CTCTGTCC	HEX	x	keine	keine Amplifikation	203			
RMS150	GT	nicht nutzbar	TGCTGCAGTat GatGCCAAAT	TGGAATCCTTT CCTTTCCIT	HEX	x	keine	keine Amplifikation	209			

Legenden zu den Abbildungen:

Abbildung 1 (zweiseitig, a und b): Elektropherogramm der PCR-Produkte der Rosensorten 10 bis 18 mit der Primerkombination RMS059. Peaks bezeichnen Allele, deren Größe automatisch berechnet (untere Zahl unter dem Peak) und einer Allelkategorie zugeordnet wurde (obere Zahl).

Abbildung 2: Verwandtschaftsanalyse der 32 Sorten anhand von 41 Mikrosatellitenmarkern der Kategorie "gut". Je weiter eine Verzweigung zwischen zwei Sorten nach rechts verschoben ist, desto näher sind sie verwandt.

Abbildung 3: Verwandtschaftsanalyse der 32 Sorten anhand von 84 Mikrosatellitenmarkern der Kategorie "gut" und "brauchbar"

Ansprüche

1. Oligonukleotide von Mikrosatellitenmarkern des Rosengenoms gekennzeichnet durch folgende Sequenzen:

Name	RMS Primer F* 5'→3'	RMS Primer R 5'→3'	Motiv
RMS00 1	TTCAAAATTGCTGCCCCCTTAG	TACCAGTTGAGTGAGAAATAGTT	GT&G C
RMS00 2	AATAATTTTTCTTTTGGTA	GATTTGTTTTCACTATTCA	GA
RMS00 3	TGGGAAAGGGAAAGCAACA	AAGGTAGGCAGAAGTGACAGACA	GA
RMS00 4	CAGGCCAAGGAAGAGGTAAGTAA A	CGTATGCGCGTGTAGGAAGG	GT&A T
RMS00 5	CTACCGGTGACCAGTGACGA	ATTTTGCCCTCTCCCTTTGT	GA
RMS00 6	ACCGGTCTCATCTTTCCATTG	GTAGGTCGGTCCGTCTGTCA	GT&G A
RMS00 7	TCTTTCCGACTCCGACAA	TATGCCATTGAGTCTCCAACAC	GA
RMS00 8	TCTCTGCGACAAAAACAAACACT	CCATGAAGCGGCGGAGAGGA	GA
RMS00 9	ATTGGCAAAAGATTCTCCTAC	ACTTGTAATTTGAGCATAA	CT&G T
RMS01 0	GGTTGGGGGAAATTGAAGCAGAG A	TCTTTTCTTCTACAAACCCCAACCA AC	GA
RMS01 1	TAGAAACGACCAATAAAAGAGG	TAACGAAACATCATCAATAGCA	GT
RMS01 2	ATAGAAAAATAGAGGGGGTGTG	GATCGAAAAGTGGTCAAAATA	GT
RMS01 3	GCCTTAGCCGGGGTTTTCAA	GATCAATACCGAACTAACAAAG	GA
RMS01 4	TATTCTTTCTTCCCACCGACGAC	CCTCACTGCCAACCCAACTGT	GA
RMS01 5	TAATGTAGGCAGATATAAAGGAG T	GCAGCTGCACAACAAGGAA	GA
RMS01 6	GGCCTGGACCTTTCTCATTTG	AACCGCTGCTGCTTTCATTTTT	GA
RMS01 7	AGGTCCCGTTATTTTCAGG	AGTTGGCTTATGGCTTTTT	AT&G T
RMS01 8	TTTTGGGTGGGTAAGTTTT	TTGGCCAATAAGGAAGACA	GT
RMS01 9	ACCGTTTCCATTACCCTTTCACC	CGTCGGCCATGGATTTTTGTA	GA
RMS02 0	AGGCGCCCATGCAAAATCAA	TTCCTAACGCAAACTATGTAAAT	GA
RMS02 1	AATTCCCTCTTACCCAAAACAC	CCGGCGAAGTCCCCTATG	GA
RMS02 2	AAGAAGATAAATTAGGGGGAAA AA	GCGCGAACATATTGATTGGT	GA
RMS02 3	TTTGCTATTAATTACAGATGAA	TAAACAATATAAATGGGGGAGTAA AT	GT

RMS02 4	ACTACTGTAAAAATATGAAAAATC C	GTAGTAGCGGTTGCAAGAAAATA	AT&G T
RMS02 5	TAATGTAAGCTAACTAATCT	TTTTAAATTTTCGGTGGAGA	AT / GT
RMS02 6	ATAGATATGTTTGGGTTC	AATGTCAGGTTTGTATG	GT
RMS02 7	ACCGTTGTGCTTATCAGGA	ATTGGTGGTGCTTTTACATTAC	AT&G T
RMS02 8	TAGGCAAGACCATGAACCAG	TGTGCCTGTTTGCTTGTGTA	AT&G T
RMS02 9	GGATAAAACCAACGGGACAGACT C	TCCGACACCATCCCTCCTACATAA	GA
RMS03 0	GATAAATTTCAAGGCGAGAG	AAAAGATGAACGACCCAAATAAT	GA
RMS03 1	TATATTAAAGAACAAGTGAGAAC	GTGGCTATCGAAAAACAA	GA
RMS03 2	AGAAACCAACCTTAGCAT	AACCATCCATATTTTCAAGTCA	AT&G T
RMS03 3	CAAGAGATGTCGGAAGCAGGA AGT	TGCACACCCAAATTTACAAACCAC A	GA
RMS03 4	GCTTCTCGGTCTCGTGCTCTC	CTCCCGCTCAAATCAATAAATCTC	GA
RMS03 5	CCTCCTTGGCAGCCTTTTCATT	ATCGGCTATCCACATCGTCTACAC	GA
RMS03 6	CTCGCGGCCCAAATAACAAT	TTGCCCTTACATTTTCTCTACTCCA TA	GA
RMS03 7	AACCTCGGAGCCGCATTTTAC	AGTTTTCCTCGCCAGATAAGC	GA
RMS03 8	GTGATAAGAGCAAAACAAGATGG	CTCGCGGAAGCCTCAAAA	GA
RMS03 9	GCTGCTTTCTCCAATCAACAA	CAGCTCAGCAAAGGGGACTA	2xGA
RMS04 0	AACCCCAAACCTTCCTAAACT	TCTGTATCTACTGTGGCTAACC	GT
RMS04 1	TTAACCCAAAGCACCAAAAT	ACCTTCACCGATGTATCACC	GA
RMS04 2	GCATGGCCAGGCTCTTCAC	ATGCCAAACGTCTCAGTCAACC	AT&G T
RMS04 3	GATCAAAGATGGGTTCTCCTCTC	AGGGGAATCTTTGAAAGTCGTTC	GA
RMS04 4	ACCGATGGATGGCAATAAC	ATACAGGACATAAACGGCTACC	AT
RMS04 5	GAAAATAAGGACATCATCTAC	GGTGCCTCCATTATTTAC	AT&G T&AT &GA
RMS04 6	AAAGGATTGCTGGATGTG	TATTCGCGTGGACTCTAT	AT&G T
RMS04 7	GCTCCCTCAATTTCCACTCA	ACCAACCCAATTCGCTCAT	GA
RMS04 8	ATAAGTATGAAAAAGTAAAATGA T	GTATACTAGAAAAACAAAACCTGGT	GA&A T
RMS04 9	AAAAATACAACCGAAAAA	CCAACCCGTCAAGGCTAAA	AT&G T
RMS05 0	TAAGCCTAAGAAAAACTCATT	CAGCCGTCAGATTCACTTG	AT&G A

		42	
RMS05	AGTAGACTGTCCTCCATTTAGC	ATACCATCAGAGAAGAGACGACA	GT
1		C	
RMS05	TTAGCCGTTAATTGAGTCGACAA	TGATGAACCCAATAGAATGAAAAC	GA
2	CCTC	AGA	
RMS05	GGCGGTAGCTAGTGACTGGAATC	CCCTTACCCTTACCCCTTTGTTAC	GA
3	T		
RMS05	CTGGGAGGAGAACTCTGTCA	TAGCTTATTAGTCTGCATTGATGA	AT&G
4			A
RMS05	TGATCACAAGAGCTTTTCAAGTTT	AGTTAGGCGCATGTACAAGAAAAT	GA
5	AG		
RMS05	TGTGTAGATTAGCATTCC	GATCTAGGATGATTCAATA	GA
6			
RMS05	CGAGGTGGGTAAGGGCGAACAAA	CCCATCCAAAGCGAGACGACGAC	GAA /
7	G		GA
RMS05	CAACCCCTGAAGCCTGAA	TTTGTAACCCATTTGACCATA	GT
8			
RMS05	ACAGTCTTATAGTGGCTTCC	TACAGGGTTCTAATTGATACATAC	AT&G
9			T
RMS06	CATTCATTTGACTCTAAGGA	TATTCTGGTCTAAGCTATTGTAA	GA
0			
RMS06	ATATCAGCCGTCCCATCAG	TTAGAAAATCCCAAACAT	GT
1			
RMS06	GCGAACGGCATTACTTGT	GGTTGTTCTGGGTGGTTTTT	GA&G
2			T
RMS06	CCACCGCCCAACAATCACAATG	GCTCTGCGGAGTGGGAATGGT	GAA
3			
RMS06	TTTTTGCAATATGTGAAGC	GATTGGTCAACCGATATGTAGAA	GA,
4			GT
RMS06	TATAGCTCGGTAGATTCAAA	CCAGACTGCCCCCAACTCATA	GA
5			
RMS06	TCCACCCACAGACCACAG	AAGCTCCCTACGATTTCACTC	GA
6			
RMS06	CAATCTGCAATCCGAATCC	ATGGTGAAAAACAGAAATACTACA	GA
7			
RMS06	GTGCGCTTTCTGCTCCATT	CATTTTGTCTACGTTTTCACTTC	GA
8			
RMS06	TCGGAGATTAAGAGTGAGGTGAG	GTGCCCACTTACCCAAACCATC	GT&G
9	T		A
RMS07	TGCCTCTCGATACAAACC	AATAAGAACCAATACCCCGAAGA	GA
0		G	
RMS07	GTTAGCATCTGGCACATTAT	AGTTCCTTGACCAGCAGAG	GT
1			
RMS07	TTAGCTCAAGAATTCATCAAAG	TCCAAACCGAGCTAAGAAAAC	GA
2			
RMS07	AAACCCCTTTTATGTAGAAGTAG	TAAAACATGAAATTATAACAATAG	AT&G
3		TG	T/GAA
RMS07	GCTTCTATCCACAGTTTCACCTC	TTCATGTCAACGCTTCTGTAAATAG	AT&G
4			T
RMS07	GCCCGTAAAAGCCCGTAAA	TTGGTCAACCGATATGTAGAAT	AT&G
5			T
RMS07	TGGATGCAAACACCTACAAA	CGTCGCCGGCATTCTGTC	GA
6			
RMS07	AGGTGAACATGGGCCAACTA	TCAAAGAATGAGTGCCTACTAAGA	GA&G
7			T
RMS07	CCATTCCAAAGTTGCACGTA	CTCTACTGCCAGCAACCACA	GT

8			
RMS07	CCGGTATGGAGAGGAATGAG	GCAATTATCCTTGACAGAACCC	GA
9			
RMS08	GCTTTCAAAGATGGGAAACCT	TTGGTATCACATTTACTCTCATTGC	GT
0			
RMS08	TTTGACACACACACACAAACAT	GACTGAGAAACAAGTCCGTCCT	GT&G
1			A
RMS08	AACAACACACGCGGAATATG	TGCAGTTGGAGTTGGAGTTG	2xGA
2			
RMS08	GACGTCCGCACTTTAGCAAC	AGGTCCTCAGCATAGACGGC	GT
3			
RMS08	GGGAGTCTCAAGAGCTACCGT	CTTCATGTAAGCCACTGGACA	GT
4			
RMS08	ATGCCCATGACTATCTTGCC	TCCAAGATGAAGAATTGCGG	GA
5			
RMS08	TTCTGTTTCATCTGGCCTCC	GTTCGTAGATTCAAGTTCGGC	GA
6			
RMS08	GCCCAACTATTCTCTCCCACT	CCCACAGTTGTCCAACACAA	GA
7			
RMS08	TCCTGATTCGTATCATCCACTG	GAAGGCCTCAAGGTTCTCT	GA
8			
RMS08	TTCTTATTGTTGGTTTGAAGAAA	TCAATAGTGAGGTGCGAGGA	AT&G
9			T
RMS09	TGTGTGTGTATCCATGGCCT	ATCTGCAATGACAATGGCAA	GT&G
0			C
RMS09	GATCAGGGTGAATACCGAGC	GCCACTCTTCTCTGTCCTCAA	GA&G
1			T
RMS09	TGAAATGAGAGACCAATTCCAA	ATCAAGTGAGCCGATGGAG	AT&G
2			T
RMS09	CGTTCTCGTTGTTGTCATCG	CCCTCTCTCTCCAGTCACGA	GA
3			
RMS09	TCCTATCCACACCGACATCA	TCACAAATACCTTCCACTCGC	GA
4			
RMS09	CCAATCTCCTCAACTCCCAG	TCAGGGCTTCTAAAGCTTGC	GA
5			
RMS09	TGACCAATATGACAGAGAACCAA	TGATAGCCTTACATATGGAAACAT	AT&G
6		T	T&AT
RMS09	ATCTGGCTGAACACCACACA	CATGCTAACTCTCCATGTTCCA	GA&G
7			T
RMS09	CACGTCCCATTCCAGAATTT	CCCTCAATGGAGAGCAAGAG	GT /
8			GA
RMS09	GGTCTGGTTCCTTGAGGTGA	CTCTCTCGTCCGAAAGCATC	GA
9			
RMS10	AGAGCTCCGCTCTGGATATG	AAGCCAAAGCTTACGTGCAT	GT&A
0			T
RMS10	GAAGAGACTGAAAGCTTGAAGGA	CTCCTCTCCACTCCTCACCA	GA
1			
RMS10	AACTAAATGGTTGAGATGCCAAA	GGAATTTTCGTTCTTAAGCTAAGTT	GT
2			
RMS10	ATTATGCGAACCACAAACGAGG	TGGCAGCATTCTCCCTAAAC	GT
3			
RMS10	CTAAAGCTTGAGCAAACAAATG	GGAGTATTGGCCGTAGGTGA	GA
4			
RMS10	TTGGTCTAATGCCCTATCCC	CCAGCCCTAGCCATAATTGA	GT&A
5			T

RMS10 6	CTCTCCCTCTCTGCATCAAA	CCTCTTCTCTGCAACCCAAG	GA
RMS10 7	CGACCTTGAACCTCGATGGAT	CATGAAAGTGGAGCTAGCTAAGAA	AT&G T
RMS10 8	GATCGCCATGGCATGTAAAG	TTCTTCTAGTTTCCGGCTGC	GA
RMS10 9	TGCAAACCTAAATTCCACAGAA	TGGCCTCTACAGCTCCTGTT	GT
RMS11 0	TATGAGAATGAGCGTGTGGG	TTCCCTCTCATTCTCTCCC	GT
RMS11 1	TTAGTCATCATCTTCAGTTATCAA GAA	ATTCAATTGGCTTCACTGGG	GA
RMS11 2	CAAGGATACCAAGTCGGAGAGA	AGAAATGGACAGCTCCGAAA	AT&G T
RMS11 3	CATGGATTGCGTGTCTTCTG	GGCATCAGAAAGCTGAAAGG	GA
RMS11 4	AGTCGCATAACAGGACTGGG	TTGGGATTTTCGGATAAGTCG	GA
RMS11 5	CGTGAAGACGCAAAGTCAAA	GGAGGAGAAGGAGGATTTGTG	GA
RMS11 6	CACCCACTGGAATACTGGCT	CGACAAGCATGACCTGAAAT	AT&G T
RMS11 7	TCTTCTTCTCTCACCGCCAT	GGCCGATTTGTTGACCTAGA	GA
RMS11 8	TGGCTATGGGAAGAACATGA	TCAGACAAATAATGCGTTACCAA	(AT&) GT
RMS11 9	GCACGCACACATATATAACAACA A	GATATCCGCAGCCAAGAAAG	AT&G T
RMS12 0	CAGTTGAAGAGAACCAAGGG	TGGTGGGTAGGGAAATGAAA	GT
RMS12 1	TCCTCTCCAAGACACAATATTCAA	GCCCTCTCTGCTCTCCCTAA	GT
RMS12 2	ATTCCACTTCCTCCTTCCCA	GGATTCTTTCCTCCTGACCC	GA
RMS12 3	AAACACTCTAAGGAGGTATTCCC TAA	CGAAGTCTCCCATGGTTTCT	GA
RMS12 4	TTTGTGGTCGTGTGTGTGTAT	AGGCACAAATACTATCCACCTG	GT
RMS12 5	AAGTGAAGACTGAGCGACCG	CTACTCCAATGTCCGCTTCC	GA
RMS12 6	AACGACCGCCTAGGAGAAA	TTGTTTCTGTTTGAATGGGT	GT
RMS12 7	TGCCTTTCTAGATTGCTGGA	TAGTTGTTCGTCACCCACCC	GA
RMS12 8	AGCATCACGAGCACATTGAG	GCGAAGATTCACCCAATGAC	GA
RMS12 9	ACGTGCACACACTCACACAC	ACTGATGCAGTTTGCTCTGA	GT
RMS13 0	CAAATCAATCTGCAAACCA	TTTGCGAATACCAGATGCAG	GA
RMS13 1	CGGCCAGAGATAACAGATGG	TGTTTGTGCTTAACTACTACAACC	GA TT
RMS13 2	TGTGGTTATGAATTGCTGGTG	TTGAGTTTGGTTGAATGGGAG	GA
RMS13	TCTGCAACAATCAGCAGAAGA	ATTTCTGGCAAATCCGAATG	GA

3	RMS13	TGAGCTCAAGCAATATGCAA	GGCTGTCTCTGATTCCAGTATG	GA
4	RMS13	GACCGATTGGAGAGGAATGA	TTGCCTTTCTCCCTTCTGTT	GA
5	RMS13	GATCATGAGAGTCGCCAAA	AAGAGGCAGATATGGAGCGA	GA
6	RMS13	TGTACATGATGATGGGACGC	GGCAATTGCAAAGACAGTCA	GA
7	RMS13	CTTCTGAGAGCCACACACCA	GCAAACACATCCCATCATCA	GA&a
8	RMS13	CAAGTATCTGCTCAGGCAAGC	CCATCACATTTCGGCTCTTCT	ndere GA
9	RMS14	CCAATAGCGATGCAATGAGA	TTGGCTACCACTAACCTCCC	GT
0	RMS14	ACAGAGACTTGACGCTGCAT	AGCGTGTGTAGCTAGGGAGC	GT
1	RMS14	TGGCCTCAACGTCTTCTACC	CCTGAAATATCCCTATGTCAGAAA	2 x GA
2	RMS14	GTGGGAAGTGTGGGAACAAC	GCCTCATCCTGTCCATCTTC	GA
3	RMS14	TTTATCACTGTCACAAGGCATTA	GAGCTCCATGAGGTGTTTCC	GT
4	RMS14	TGCTCACTTACCCAGAAGCC	TCTCTCTCATTTCAAGAGTAAACCC	2 x GA
5	RMS14	ACAAGGCATTACCTTGGTT	TTTCTGGGCCTGCATAAATA	GT
6	RMS14	CCAATCTCAATAACACCGAGC	TCTTTGTGCTGCTAATGCTCA	AT&G
7	RMS14	TTAGCAGGCATTGGCACTAT	ACCTCCAGCACCAACTCCT	T GT
8	RMS14	CGGTGTGTAGTTGATTCGGA	TCAAATTCTGGCCTCTGTCC	AT&G
9	RMS15	TGCTGCAGTATGATGCCAAT	TGGAAATCCTTTTCCTTTCCTT	T&AT GT
0				

2. Testkit zur genetischen Analyse von Kultur- und Wildformen der Gattung Rosa umfassend ein oder mehrere Oligonukleotidpaare nach Anspruch 1.
3. Testkit nach Anspruch 2 umfassend mindestens ein Oligonukleotidpaar folgender Mikrosatellitenmarker: RMS001 RMS003 RMS008 RMS011 RMS015 RMS017 RMS024 RMS030 RMS034 RMS035 RMS039 RMS042 RMS043 RMS044 RMS045 RMS046 RMS050 RMS051 RMS054 RMS055 RMS060 RMS061 RMS071 RMS073 RMS078 RMS079 RMS080 RMS082 RMS086 RMS091 RMS094 RMS108 RMS110 RMS116 RMS117 RMS118 RMS122 RMS125 RMS126 RMS129 RMS132 RMS137 RMS147 RMS023 RMS027 RMS029 RMS037 RMS038 RMS047 RMS052 RMS057 RMS058 RMS059 RMS062 RMS063 RMS065 RMS066 RMS070 RMS072 RMS077 RMS084

RMS059 RMS062 RMS063 RMS065 RMS066 RMS070 RMS072 RMS077
RMS084 RMS088 RMS089 RMS090 RMS095 RMS097 RMS098 RMS102 RMS103
RMS104 RMS107 RMS112 RMS113 RMS115 RMS120 RMS128 RMS138 RMS139
RMS140 RMS143 RMS144 RMS145 RMS146 RMS148.

4. Testkit nach Anspruch 2 umfassend mindestens ein Oligonukleotidpaar folgender Mikrosatellitenmarker: RMS023 RMS027 RMS029 RMS037 RMS038 RMS047 RMS052 RMS057 RMS058 RMS059 RMS062 RMS063 RMS065 RMS066 RMS070 RMS072 RMS077 RMS084 RMS088 RMS089 RMS090 RMS095 RMS097 RMS098 RMS102 RMS103 RMS104 RMS107 RMS112 RMS113 RMS115 RMS120 RMS128 RMS138 RMS139 RMS140 RMS143 RMS144 RMS145 RMS146 RMS148
5. Testkit nach Anspruch 2 umfassend mindestens ein Oligonukleotidpaar aus folgendem Set: RMS023, RMS029, RMS038, RMS047, RMS052, RMS057, RMS059, RMS062, RMS065, RMS070, RMS077, RMS088, RMS089, RMS095, RMS097, RMS102, RMS103, RMS104, RMS112, RMS115, RMS120, RMS128, RMS139, RMS146 oder RMS148.
6. Testkit nach Anspruch 2 oder 3 umfassend folgende Oligonukleotidpaare: RMS023, RMS029, RMS038, RMS047, RMS052, RMS057, RMS059, RMS062, RMS065, RMS070, RMS077, RMS088, RMS089, RMS095, RMS097, RMS102, RMS103, RMS104, RMS112, RMS115, RMS120, RMS128, RMS139, RMS146 oder RMS148.
7. Verfahren zur Herstellung von Mikrosatellitenmarkern für Pflanzen der Gattung Rosa, dadurch gekennzeichnet, dass hypervariable Genomabschnitte (sogenannte Mikrosatelliten) mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) zu polymorphen Fragmenten in Gegenwart mindestens eines Oligonukleotidpaares gemäß Anspruch 1, das links und rechts für jeden Mikrosatelliten-Locus eine Mikrosatellitensequenz flankiert, amplifiziert, anschließend aufgetrennt und detektiert werden.
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Auftrennung der Mikrosatellitenmarker gelelektrophoretisch, insbesondere durch hochauflösende Agarosegele, native Polyacrylamidgele, denaturierende Polyacrylamidgele oder massenspektrometrisch erfolgt.
9. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Detektion je nach Trennungssystem über Ethidiumbromidfärbung, Silberfärbung, bei radioaktiver Markierung über Autoradiographie oder mittels automatischem Sequenziergerät unter Verwendung farbstoff- bzw. fluoreszenzmarkierter Primer oder massenspektrometrisch erfolgt.

10. Verwendung der Oligonukleotide nach Anspruch 1 zur genetischen Analyse von Kultur- und Wildformen der Gattung Rosa.
11. Verwendung nach dem Anspruch 10 zur genetischen Kartierung und Markierung von monogenen und polygenen Eigenschaften und deren Selektion, zur Verwandtschaftsanalyse und Sortenidentifikation sowie zur Evaluierung von Sortenreinheit, Hybrididentifikation und Pflanzenzüchtung.

1 / 4

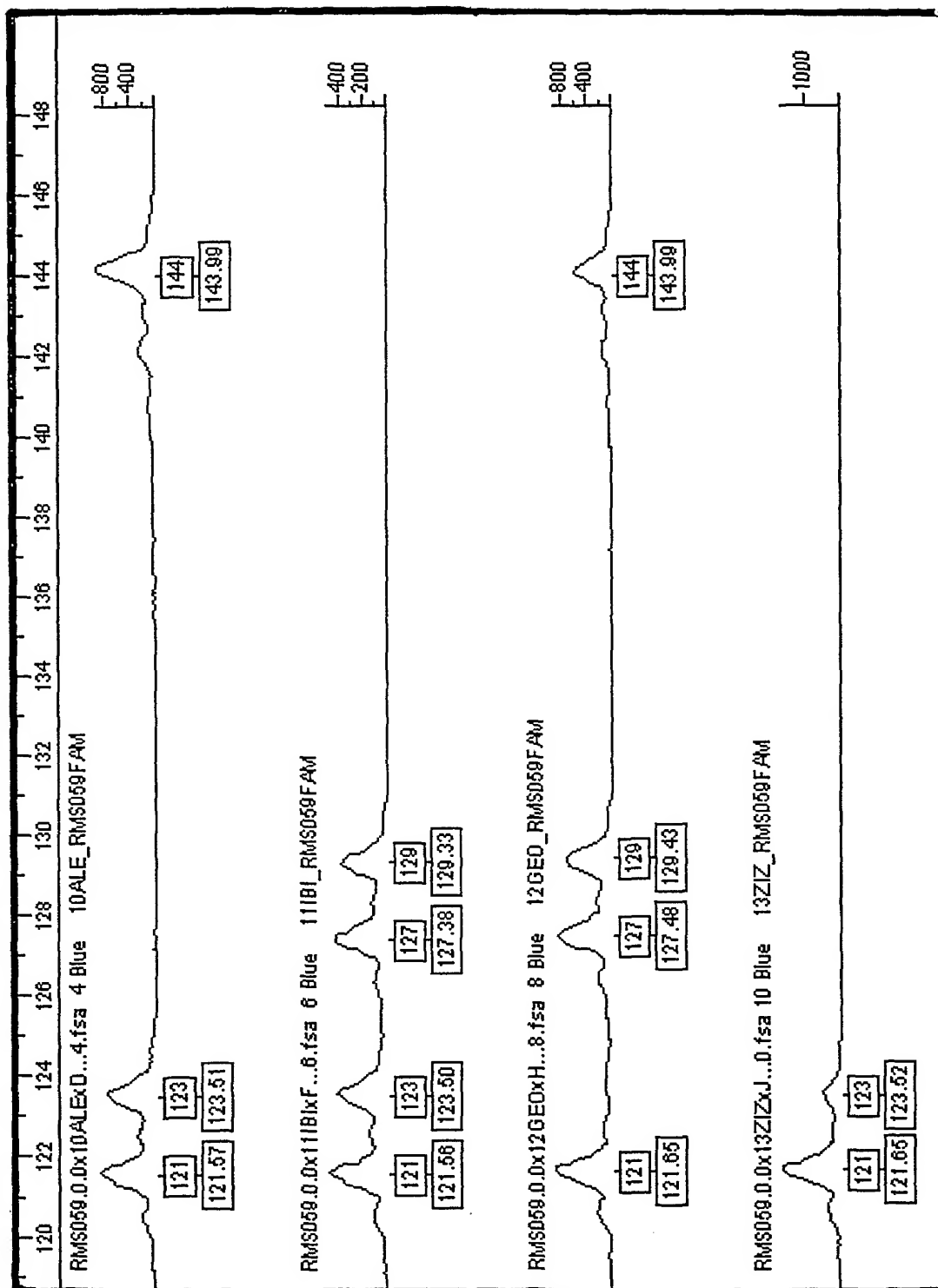


Abbildung 1a

2 / 4

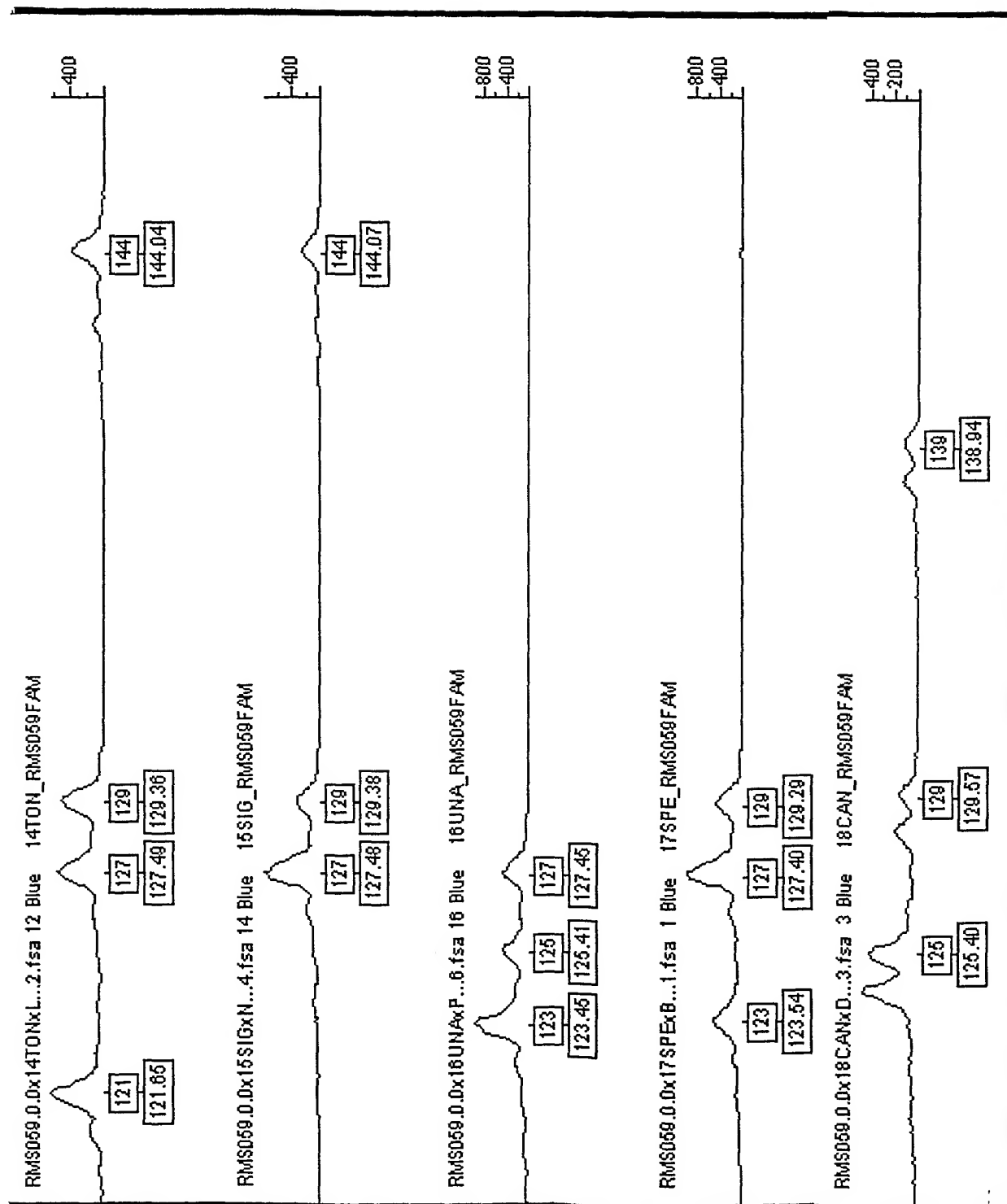


Abbildung 1b

Abbildung 2:

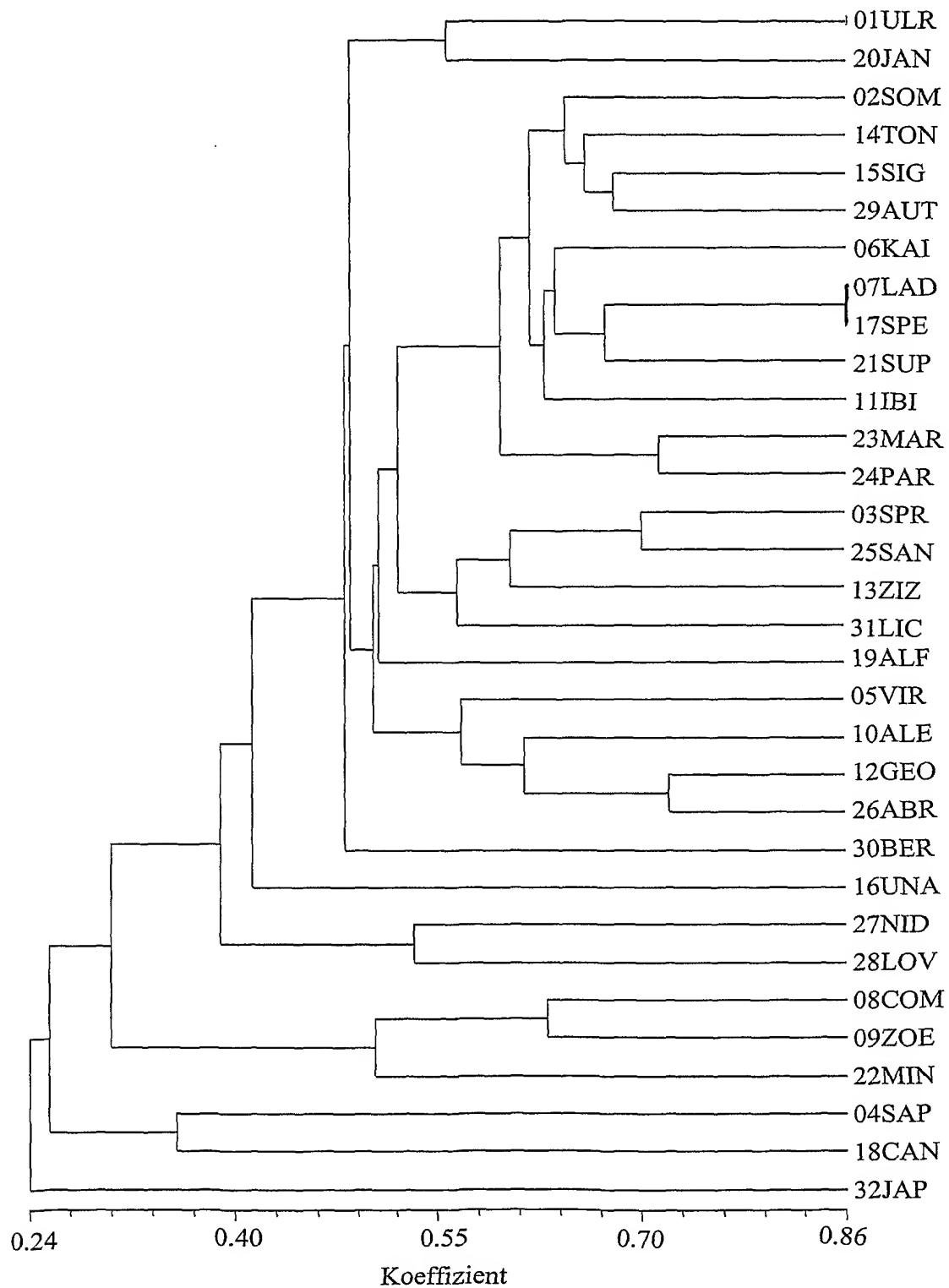


Abbildung 3:

